EINIGE BEITRÄGE

ZUR

KENNTNIS DES INVERTINS DER HEFE.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

EINER

HOHEN NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT ZU TÜBINGEN

VORGELEGT VON

BOREN HAFNER

AUS **AGRAM.**

ACAD. MED. BAT. ZAGR.

WÜRZBURG.

C. J. BECKER'S UNIVERSITÄTS-BUCHDRUCKEREI.

1903.

Von der Fakultät angenommen den 8. Mai 1903.

Die vorliegende Arbeit wurde im Tübinger physiologisch-chemischen Laboratorium auf Anregung und unter Leitung des Herrn Professor Dr. *G. v. Hüfner* in der Zeit vom Oktober 1901 bis März 1903 ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer Herrn Professor Dr. *G. v. Hüfner* an dieser Stelle für seine persönliche Liebenswürdigkeit und Güte, sowie für das rege Interesse und freundliche Unterstützung, welche er jederzeit meiner Arbeit zu teil werden liess, meinen aufrichtigsten und besten Dank auszusprechen.

Tübingen, im Mai 1903.

B. Hafner.

I. TEIL.

Berthelot war der erste, der es versuchte, aus der Hefe das invertierende Enzym zu isolieren.[1]) Schon durch frühere Forscher war es bekannt, dass Rohrzucker von der Hefe nicht direkt vergärbar ist, sondern dass er durch Hydrolyse meist in Invertzucker gespalten und dann erst zu Alkohol und Kohlensäure zerlegt oder vergoren wird. Man glaubte, dass diese Spaltung, die man Inversion nannte — da das neu gebildete Zuckergemenge die Ebene des polarisiierten Lichtes nach links dreht, der Rohrzucker, aus dem es entstanden, aber nach rechts — dem Säuregehalt der Hefe zuzuschreiben sei; *Pasteur* glaubte sie sogar auf die Bernsteinsäure zurückführen zu müssen, die, wie er nachwies, bei der Gärung gebildet wird. *Berthelot* zeigte, dass die Inversion von der Reaktion der Flüssigkeit unabhängig ist, dass sie vielmehr auf ein lösliches Prinzip zurückzuführen ist, das wahrscheinlich von der Hefe ausgeschieden wird, da es im Wasser, in dem die Hefe gewaschen wurde, vorzufinden war.

Um die *Pasteur*sche Behauptung auf ihre Richtigkeit zu prüfen, dass die Hydrolyse des Rohrzuckers durch die bei der Gärung gebildete Bernsteinsäure hervor-

[1]) Comptes rendus. Bd. 50 (1860) S. 980.

gerufen werde, liess er gut ausgewaschene Hefe mit der zweifachen Menge Wasser einige Stunden stehen. Nach der Filtration versetzte er eine 20 %ige Rohrzuckerlösung, die 2 % Natriumcarbonat enthielt, mit etwas von diesem wässerigen Hefeextrakt und konnte sich nach einiger Zeit von der Anwesenheit von Invertzucker überzeugen. Die Flüssigkeit reagierte aber bis zum Schluss alkalisch und es war somit bewiesen, dass die Spaltung nicht durch eine Säure bewirkt war.

Berthelot versuchte auch, das Enzym aus Hefe darzustellen. Er fällte das Enzym aus einem wässerigen Hefeextrakt mit dem doppelten Volumen Alkohol aus und trocknete den flockigen Niederschlag bei gewöhnlicher Temperatur, wobei er eine hornartige Substanz erhielt. Dieses war allem Anschein nach noch stark mit Eiweiss verunreinigt, was namentlich daraus hervorging, dass es durch Kochen aus der wässerigen Lösung gefällt wurde.

Hoppe-Seyler[1]) bemerkte, dass aus der lebenden Hefe das Enzym ziemlich schwer mit Wasser zu extrahieren ist. Tötete er nämlich die Hefe zuerst durch Zusatz von etwas Aether, so liess sich das Enzym in der Tat leichter durch Wasser ausziehen und konnte dann auch aus der Lösung leicht mit Alkohol ausgefällt werden. *Hoppe-Seyler* zeigte auch im Jahre 1871 auf der 44. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Rostock ein von ihm aus einer mit Aether getöteten Bierhefe dargestelltes Präparat vor. Dasselbe stellte ein weisses Pulver dar, das im trockenen Zustande und unter Alkohol unverändert aufbewahrt werden konnte; es schien auch, dass sein Präparat ziemlich rein war, wenigstens von grösseren

[1]) Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. IV 1871 S. 810.

Mengen Eiweiss befreit, da es nach seinen Angaben in Wasser löslich war und dabei ein starkes Inversionsvermögen besass. Über die Zusammensetzung, namentlich den Aschengehalt des Pulvers, sowie ob es Reaktionen auf Eiweiss zeigte, darüber hat *Hoppe-Seyler* nichts mitgeteilt.

Ein viel weniger gutes und noch sehr unreines Präparat ist von *Gunning*[1]) dargestellt worden. Er zerteilte reine, gut gewaschene und ausgepresste Hefe in Glycerin und extrahierte sie damit einige Tage bei mässig warmer Temperatur. Die durch eine dünne Schicht Bimstein, die mit Filtrierpapier überdeckt war, an einer Pumpe klar filtrierte Flüssigkeit reduzierte beim Erwärmen die *Fehling*sche Lösung nicht, invertierte aber Rohrzucker ziemlich schnell. Wurde das Glycerinextrakt mit viel Alkohol versetzt, so fiel daraus ein gelbliches, in Wasser unlösliches, dem Rohrzucker gegenüber sich passiv verhaltendes Pulver aus, welches die Schwefelreaktion und alle bekannten Reaktionen der Eiweisskörper gab.

Der erste, der sich eingehender mit dem invertierenden Enzym der Hefe befasste, war *Donath*.[2]) Von ihm stammen die ersten Elementaranalysen des Enzymes und er war es auch, der dasselbe zum ersten Male Invertin nannte, während man es in neuerer Zeit auch als Invertase bezeichnet.

Donath verwendet zur Darstellung des Invertins die Methode von *K. Zulkowski* und *E. König*.[3]) Er erschöpfte zunächst die Hefe mit absolutem Alkohol, presste sie dann ab und trocknete sie bei gelinder Temperatur.

---

[1]) Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. V. S. 821.

[2]) Berichte d. deutschen chem. Gesellsch. Bd. VIII 1875. S. 795.

[3]) Wiener Sitzungsberichte der k. Akademie der Wissenschaften. Bd. 71. S. 453.

Die dabei resultierende spröde Masse wurde in fein zerriebenem Zustande bei gewöhnlicher Temperatur mit Wasser ausgezogen und dann das wässerige Extrakt so lange durch doppelte Filter filtriert, bis das Filtrat frei von Hefezellen war. Das Filtrat wurde alsdann mit Aether durchgeschüttelt, worauf sich eine froschlaichartige Masse abschied, die sich in der Aetherschicht ablagerte. Die ätherhaltige Gallerte wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit Wasser gewaschen und sodann durch Eintropfen in absoluten Alkohol in weissen Flocken gefällt, die abfiltriert, mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vacuum getrocknet wurden. Die auf solche Weise erhaltenen Präparate waren nicht immer von derselben Beschaffenheit; war z. B. die durch Ausschütteln mit Aether erhaltene Gallerte rein weiss, so wurde auch das daraus gewonnene Präparat pulverig und weiss, sonst aber hornartig und dunkel gefärbt. In Wasser war das *Donath*sche Enzym allem Anschein nach nicht eigentlich löslich, sondern nur sehr aufquellbar; die scheinbare Lösung liess sich deshalb auch nur schwer filtrieren; sie invertierte aber Rohrzuckerlösung, übte dagegen auf Stärke und Dextrin gar keine Wirkung aus. Die Substanz gab zwar die *Millon*'sche Reaktion, nicht aber diejenige von *Adamkiewiez*. Die Analyse seines reinsten Präparates gab folgende Werte:

	C	H	N	
I	40.48 %	6.88 %	9.47 %	(*Dumas*)
II	40.53 %	6.38 %	9.39 %	(*Will-Varrentrapp*)

Nach *Donath* sprechen diese Zahlen entschieden dagegen, dass diese Substanz zu den Eiweisskörpern gehört.

Unter Berücksichtigung einer Bemerkung von *Hüfner*[1]),

[1]) Journal d. praktische Chemie N. F. V. S. 372.

dass umgeformte Fermente, z. B. Pankreasferment in Lösungen auf 70° erhitzt unwirksam werden, im trockenen Zustande aber, ohne an Wirksamkeit einzubüssen, auf 100° erhitzt werden können, arbeitete *Barth*[1]) im Jahre 1878 ein neues Darstellungsverfahren für Invertin aus. Er trocknete frische Presshefe bei gewöhnlicher Temperatur in flachen Schalen, bis sie sich zwischen den Fingern zu einem staubfreien Pulver zerreiben liess und erschöpfte sodann die lufttrockene Substanz im Luftbade noch etwa 6 Stunden lang auf 100—105°. Nach dem Erkalten rührte er die Masse partienweise mit Wasser zu einem gleichmässigen Brei an, den er dann 12 Stunden bei 40° stehen liess. Der wässerige Auszug wurde zuerst durch ein Koliertuch gepresst, dann durch Faltenfilter filtriert. Das gelbbraune dünnflüssige Filtrat goss er in das 5—6-fache Volumen Alkohol von 95 % ein und erzeugte dadurch einen weissen, wolkigen Niederschlag, der sich beim Umrühren bald flockig zusammenballte, klar absetzte und gut abfiltrieren liess. Nach dem Abfiltrieren digerierte er den Filterrückstand mit wenig Wasser. Dabei ging das Enzym in Lösung und die durch Alkohol in Wasser unlöslich gemachten Eiweissverunreinigungen blieben nach dem Filtrieren auf dem Filter ungelöst zurück. Durch Eingiessen der Lösung in die 5—6fache Menge Alkohol schied sich dann das völlig eiweissfreie Invertin aus, das nach dem Auswaschen mit absolutem Alkohol und Trocknen im Vacuum ein schneeweisses, leicht zerreibliches Pulver darstellte. Wurde zum Auswaschen 95 %iger und nicht absoluter Alkohol verwendet, so blieb das Präparat klebrig, trocknete aber im Vacuum zu einer braunen, harten hornartigen Masse

1) Bericht d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XI (1878) S. 474.

ein, die sich in Wasser schwer wieder löste und unwirksam war.

Barth analylisierte seine Präparate und fand bei einem derselben, das wirksam war, 22.01 % Asche. Auf aschenfreie Substanz berechnet, enthielten sie im Mittel: C 44.9 %; H 8.4 %; N 6.0 %; S 0.63 %; O 40 57 %. Die Präparate gaben mit Wasser eine neutrale gelbbraune klare Lösung, der alle charakteristischen Eiweissreaktionen fehlten. Es wurde auch, zur genauen Prüfung, ob das Invertin eine Ähnlichkeit mit den Eiweisskörpern besitzt, etwas von der Substanz mit nicht zu konzentrierter Schwefelsäure 5 Stunden lang gekocht, doch konnte nach dem Neutralisieren kein Leucin als Spaltungsprodukt gefunden werden. *Barth* glaubt, dass der Schwefel zum Invertinmolekül gehört, da er sich beim Kochen der Invertinlösung mit Natronlauge durch Nitroprussidnatrium und durch alkalische Bleioxydlösung nicht nachweisen lässt, sondern erst beim Oxydieren der Substanz im schmelzenden Salpeter zum Vorschein kommt. Wäre das Präparat rein gewesen und demnach schwefelhaltig, so würde dem gefundenen Schwefelgehalt, da derselbe sehr gering war, nur ein sehr hohes Molekulargewicht haben entsprechen können.

Von noch vielen anderen Untersuchungen wäre zunächst die durch ihre eigenartige Anschauung über die Natur des Invertins interessante Arbeit von *Sullivan* und *Tompson*[1]) zu erwähnen. Sie verwendeten zur Darstellung von Invertin obergärige Hefe, die sie in verschlossenen Gefässen bei 15—20° etwa einen Monat stehen liessen, bis sie sich vollständig verflüssigte. Die flüssige Masse wurde ausgepresst und dann filtriert. Zum Filtrat wurde

---

[1]) Journal of the Chem. Soc. 57 1890 I S. 839—931.

langsam solange Alkohol zugegossen, bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Die Flüssigkeit, die 47 % Alkohol enthielt, liessen sie dann zwei Tage ruhig stehen. Nach dieser Zeit wurde die klare Flüssigkeit abgegossen und der Niederschlag mit 47 %igem Alkohol gut ausgewaschen. Als dann der so gewaschene Niederschlag mit Wasser verrieben wurde, blieb ein Teil ungelöst, den die Verfasser Hefeneiweiss nannten. Die Invertinlösung enthielt noch eine Menge Asche, die aus einem Gemenge von Kalium- und Magnesiumphosphat bestand. Der Gehalt an Asche konnte durch Dialyse herabgedrückt, aber nicht ganz entfernt werden, er betrug nach der Dialyse immer noch 0.45 %.

Das nach diesem Verfahren dargestellte und gereinigte weisse Präparat, löste sich in Wasser. Die wässerige Lösung trübte sich beim Aufkochen nicht, gab auch mit *Millon*'schen Reagens in der Kälte keine Fällung, färbte sich aber beim Erhitzen etwas rötlich. Durch Alkohol konnte die Invertase aus ihren Lösungen wieder gefällt werden, wurde dabei aber bis zu einem gewissen Grade zerstört. Durch längere Einwirkung von Alkohol verlor sie ihr Inversionsvermögen sogar gänzlich.

Die Zusammensetzung war folgende:

46.41 % Kohlenstoff
6.63 % Wasserstoff
3.69 % Stickstoff.

Nach *Sullivan* und *Tompson* zerfällt das Invertin bei fortgesetztem Zusatz von Säure und Alkohol in eine Reihe von verschiedenen Körpern, die sie als Invertan-Reihe bezeichneten. Die von ihnen dargestellten und untersuchten sieben Glieder dieser homologen Reihe, die sie als α-, β-, γ-, δ-, ε-, η-Invertan bezeichneten, unterscheiden

sich untereinander durch Stickstoffgehalt, Molekulargewicht und Drehungsvermögen. Das invertierende Enzym selbst ist das zweite in der Reihe, das β-Invertan.

Das von *Sullivan* und *Tompson* dargestellte Invertin ist kein Eiweisskörper, färbt sich aber beim Kochen mit *Millon*'schem Reagens fleischfarben, da es in seinem Molekül gewisse Bestandteile des Eiweisses enthält. Die Verfasser nehmen nämlich an, dass die ersten 6 Glieder der Invertan-Reihe Verbindungen von Hefeeiweiss mit dem 7. Glied dem γ-Invertan seien. Das letztere wieder sei wahrscheinlich eine Verbindung von einem Teil Hefeeiweiss mit 18 Teilen Kohlenhydrat und bilde einen konstanten Bestandteil des Komplexes. In Wasser waren alle Glieder der Reihe leicht und klar, ausgenommen das α-Invertan, löslich, diffundierten aber durch Pergamentmembran nicht hindurch.

Im Jahre 1898 veröffentlichte *Wroblewski*[1]) eine Arbeit „über die chemische Beschaffenheit der amylolytischen Fermente", in der er auch einiges über das Invertin mitteilt.

Wroblewski benützte zu seinen Untersuchungen zuerst ein Invertinpräparat von *Merck*, welches aus Presshefe dargestellt war. Er fällte aus dessen wässeriger Lösung die Proteinstoffe mit *Brücke*schem Reagens und überzeugte sich so, dass dieses Präparat eine beträchtliche Menge von einem Kohlenhydrat enthält, welches *Fehling*sche Lösung nur nach dem Aufkochen mit Salzsäure reduziert. Dieses Kohlenhydrat wirkt nicht invertierend, es dialysiert schwer, aber leichter als die Proteinstoffe.

Zur Darstellung von möglichst reinem Invertin schlug

---

[1]) Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XXXI S. 1130.

Wroblewski folgendes Verfahren ein: 60 gr Invertin von *Merck* wurden mit 60 cc. Wasser zerrieben, im Filtrate wurde ein Niederschlag mit Alkohol erzeugt, dieser wieder in Wasser gelöst und die Lösung mit Ammonsulfat gesättigt. Den hiedurch erzeugten Niederschlag löste er abermals in Wasser und unterwarf die Lösung solange der Dialyse, bis die Flüssigkeit keine Trübung mit Baryumchlorid mehr gab. Aus der dialysierten Flüssigkeit wurde endlich das Invertin durch Zusatz gleicher Volumina Alkohol und Aether ausgefällt. Das erhaltene Invertinpräparat war frei von Kohlenhydrat, gab die *Millon*'sche und Biuretreaktion und invertierte Rohrzucker sehr stark. *Wroblewski* stellte auch direkt aus Hefe ein kohlenhydratfreies Invertin dar.

Zu diesem Zwecke verrieb er Presshefe mit der doppelten Menge Seesand und extrahierte dann mit 20 %igem Alkohol. Im Filtrat erzeugte er durch Alkohol und Aether einen spärlichen, schneeweissen Niederschlag, welcher stark invertierend wirkte und einen Proteinstoff darstellte, der mit kleinen Mengen Kohlenhydrat verunreinigt war. Nach der Behandlung dieses Niederschlages mit Ammonsulfat, wie es früher mit dem *Merck*schen Präparat geschah, erhielt er nach der Dialyse eine sehr kleine Menge von einen stark wirksamen Proteinstoffe.

Wroblewski ist der Ansicht, dass alle von früheren Forschern dargestellte Invertinpraparate, so dasjenige von *Barth*, von *Donath* etc. mit einem Kohlenhydrate verunreinigt waren, und dass dies der Grund gewesen, weshalb der Stickstoffgehalt derselben zu niedrig gefunden und gemeint wurde, das Invertin selber sei überhaupt keine Proteinsubstanz. Im hiesigen physiologisch-chemi-

schen Laboratorium wurde das Invertin von *A. W. Osborne*[1]) und *M. Kölle*[2]) genauer untersucht.

Osborne benützte als Ausgangsmaterial zu seinen Untersuchungen ein aus Presshefe dargestelltes Rohinvertinpräparat. Zu diesem Zweck wurde die Hefe zuerst mit 96 %igem Alkohol angerieben und dann bei Zimmertemperatur 16—24 Stunden ruhig stehen gelassen, um die Eiweissstoffe zu koagulieren. Nachdem er den Alkohol abfiltriert hatte, extrahierte er den Hefebrei mit Chloroformwasser 6 Tage lang bei einer Temperatur von 30—35°. Am Ende brachte er den wässerigen Hefebrei auf mehrere Faltenfilter, aus denen das Filtrat sofort in grosse 1 Liter fassende Glascylinder abtropfte, deren jeder zu etwa ¾ mit 96 %igen Alkohol gefüllt war. Die flockigen Niederschläge, die im Alkohol von den einzelnen Tropfen erzeugt wurden, ballten sich zu einem Klumpen zusammen, der von der Flüssigkeit getrennt mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet wurden. Nach dem Trocknen stellte das so gewonnene Rohinvertin eine grauweisse, bröckliche Masse dar, die sehr wirksam war und eine grosse Menge mineralischer Substanzen enthielt. Zwei verschiedene Präparate, die auf diese Weise dargestellt waren, gaben 44.58 und 31.62 % Asche.

Osborne versuchte den hohen Aschengehalt seiner Rohpräparate herabzudrücken ohne dabei die enzymatische Kraft des Invertins zu beeinträchtigen. Dies konnte er am besten durch Anwendung der Dialyse ausführen. Durch Dialyse konnte der Aschengehalt bis auf 1.72 % herabgedrückt werden, ohne dass der organische Rest etwas an Wirksamkeit eingebüsst hätte.

[1]) Zeit. f. physiol. Chem. XXVIII, S. 399.
[2]) Zeit. f. physiol. Chem. XXIX, S. 428.

Die Zusammensetzung der durch Dialyse gereinigten Präparate war, auf aschenfreie Substanz berechnet, im Mittel:

44.69 % Kohlenstoff
6.51 % Wasserstoff
6.10 % Stickstoff.

Osborne prüfte auch die wässerige Lösung seiner gereinigten Präparate auf Eiweiss und zeigte, dass das von ihm dargestellte Enzym weder eiweiss- noch peptonartiger Natur ist. *Osborne* beobachtetete auch, dass die Substanz beim Kochen mit Salzsäure einen reducierbaren Körper liefert, konnte aber wegen Mangels an Material dessen wahre Natur nicht feststellen.

Erst *Kölle* konnte, nachdem er sich grössere Mengen des Ausgangsmaterials verschafft hatte, die reducierende Substanz isolieren. Auch er benützte zur Reinigung seiner Präparate die Dialyse. Die Zusammensetzung der Invertinpräparate war, auf aschenfreie Substanz berechnet, abgesehen vom Kohlenstoffgehalt, etwas abweichend von derjenigen der *Osborne*schen Präparate.

Die Analysen gaben:

43.90 % bis 45.60 % Kohlenstoff
6.45 % „ 7.34 % Wasserstoff
8.34 % „ 8.61 % Stickstoff.

Um Klarheit über die Natur des reduzierten Körpers zu gewinnen, kochte *Kölle* das durch Dialyse gereinigte Invertin ca. 10 Stunden mit verdünter Salz- oder Schwefel-Säure und isolierte nach der Neutralisation der Säure die reduzierende Substanz mit p-Bromphenylhydrazin. Das abgeschiedene Hydrazon stellte nach dem Umkrystalisieren aus 60 %igen Alkohol seidenglänzende Täfelchen dar, die schwer löslich in heissem Wasser und Alkohol, unlöslich in kaltem Alkohol und Aether waren.

Schmelzpunkt, Löslichkeitsverhältnisse und das Ergebnis der Analyse kennzeichneten die Verbindung als das p-Bromphenylhydrazon der *Mannose.*

Salkowski[1]) ist der Ansicht, dass alle bis jetzt hergestellten Invertinpräparate einschliesslich der gereinigten von *Osborne* und *Kölle* mit einem Kohlenhydrat nur verunreinigt waren.

Dieses Kohlenhydrat isolierte *Salkowski* schon früher[2]) aus Presshefe indem er dieselbe mit 3 % iger Kalilauge in der Wärme behandelte und aus der alkalischen Lösung das Kohlenhydrat mit Kupfersulfat als Kupferverbindung ausfällte. Die Kupferverbindung versetzte er mit verdünnter Salzsäure und fällte aus der salzsauren Lösung das Kohlenhydrat, welches er Hefegummi nennt, mit Alkohol aus. Charakteristisch für dieses Kohlenhydrat ist der sich zähe zusammenballende Niederschlag, der in seiner wässerigen Lösung mit *Fehling*scher Lösung entsteht. *Salkowski* versetzte auch eine schwach alkalische Lösung von Invertin direkt mit *Fehling*'scher Lösung und erhielt dabei den charakteristischen Gummikupferniederschlag, er zeigte auch dass dieses wie auch das direkt aus Hefe dargestellte Kohlenhydrat (Hefegummi) beim Kochen mit Säure Mannose liefert. Er ist, wie gesagt der Ansicht, dass die Mannose, die *Kölle* bei der hydrolytischen Spaltung des Invertins erhalten hatte, nicht wie es *Osborne* und *Kölle* annehmen, von einem dem Invertinmolekül angehörenden, sondern von einem dem Invertin nur als Verunreinigung beigemengten Kohlenhydrat (Hefegummi) herstammt.

---

[1]) Zeit. f. physiol. Chemie XXXI, S. 305.

[2]) Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XXVII. 1894. S. 497.

Salkowski versuchte nun gummifreies Invertin zuerst aus Hefe und als ihm das nicht gelang, aus fertigen Präparaten darzustellen, aber immer ohne Erfolg.

In Übereinstimmung mit *Barth, Osborne* und *Kölle* hällt *Salkowski* das Invertin nicht für einen Eiweisskörper, auch nicht im weitesten Sinn des Wortes, er steht daher im Widerspruch mit *Wroblewski*[1]), der auf jeden Fall im Invertin ein Proteinderivat erkennen will.

In seiner ersten Abhandlung sagt *Wroblewski*[2]), Invertin ist durch Ammonsulfat fällbar und daher ein Proteinstoff. In der zweiten Abhandlung[1]) in der er quantitative Bestimmungen mitteilte, brachte er den Beweis, dass das Invertin nicht aussalzbar ist. Da es hiernach kein Protenstoff sein kann, wird es als ein den proteosen- oder peptonartigen Proteinstoffen zugehörender Körper angesprochen.

Auch *Wroblewski* ist der Meinung, dass das Hefe gummi nur eine Verunreinigung des wahren Invertins sei und führt als Beweis die Isolierung des Hefegummis mit *Brücke*schen Reagenz an, von dem er angiebt, dass es ein wenig angreifbares Mittel sei.

In aller letzten Zeit versuchte *Ochima*[3]) ein kohlenhydratfreies Invertin herzustellen. Nachdem auch ihm alle Versuche, durch einfache Fällung mit Alkohol zum Ziele zu gelangen, misslungen waren, führte endlich die Fällung des Enzymes mit Kupferacetat anscheinend zu einem günstigen Resultate. Er selbst aber nennt sein Verfahren keinen glatten Weg. Er versetzte nämlich die neutrale Rohinvertinlösung mit einer 5 %igen Kupfer-

[1]) Journal f. praktische Chem. Nr. 64, S. 1—70.
[2]) Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XXXI (1898) S. 1130.
[3]) Zeit. f. physiol. Chem. XXXVI, S. 42.

acetatlösung, versetzte den entstandenen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, filtrierte vom Kupfersulfid ab und fällte aus dem Filtrat das Invertin mit Alkohol. Er erhielt so ein grauweisses, leicht in Wasser lösliches Pulver, welches frei von Eiweiss und Kohlenhydrat war.

Eine Analyse dieses Präparates, das an Wirksamkeit merklich verloren hatte, konnte er aber wegen der geringen Substanzmenge, die ihm zu Gebote stand, leider nicht ausführen.

II. TEIL.

Nachdem sich ergeben hatte, dass die Angaben aller früheren Forscher über die Natur des Invertins keineswegs übereinstimmmen, ja sogar sich manchmal direkt widersprechen, versuchte ich der Lösung der Frage, durch erneute Experimente in bestimmter Richtung, näher zu kommen.

Ich legte mir vorläufig folgende Fragen vor:

1. Die Asche des Invertins ist immer phosphorsäurehaltig und besteht hauptsächlich aus Kalium- und Magnesiumphosphat. Lässt sich die Phosphorsäure ganz aus den Präparaten entfernen, ohne die Wirksamkeit derselben zu zerstören, oder gehört der Phosphor vielmehr zur Konstitution der wirksamen Gruppe? Da wir über die Menge der in den wirksamen Präparaten enthaltenen Phosphorsäure kaum etwas Sicheres wissen, ist eine Reihe von Roh- und gereinigten Invertinen zu veraschen und in der Asche die Phosphorsäure quantitativ zu bestimmen.

2. Gehört das im Invertin vorkommende Kohlenhydrat zur Konstitution des Enzymes, oder ist es eine Verunreinigung? Wenn das letztere der Fall ist, so muss ein Invertin, welches vom Kohlenhydrat befreit ist seine enzymatische Kraft beibehalten.

3. Stammt der im Invertin enthaltene Stickstoff von Proteinderivaten, oder von einer oder mehreren anderen stickstoffhaltigen Gruppen?

Zur Reinigung aller meiner Invertinpräparate verwendete auch ich wie *Osborne* und *Kölle* die Dialyse. Ich benützte dazu einen von Prof. *v. Hüfner* neuerdings konstruierten Apparat, den ich, da derselbe sehr einfach ist und sich beim längeren Gebrauch als sehr praktisch und zweckentsprechend erwiesen hat, hier kurz beschreiben will.

Das Prinzip des ganzen Apparates besteht darin, dass sowohl die der Dialyse unterworfene Lösung, wie die Flüssigkeit, von welcher der Dialysator von aussen umgespült wird, in fortwährender Bewegung erhalten werden, aber so, dass die Geschwindigkeit aussen und innen verschiedene sind, die Innen- und Aussenflüssigkeit also an einander vorbeigleiten.

Das cylinderförmige Porzellangestell*) A dessen Querdurchmesser 10 cm und dessen Länge 25 cm beträgt und wie bei A[1]) abgebildet, bis oben von einer Pergamentmembran umschlossen wird, in die man die zu dialysierende Flüssigkeit bis zu 1 1/2 Liter einfüllt, ist mit der Rolle D verbunden, so dass das ganze durch Vermittelung der Triebschnur F von der Wasserturbine E in Bewegung gesetzt werden kann. Die Axe der Rolle

*) Dieses Porzellangestell ist auf Bestellung von der k. Porzellan-Manufaktur in Berlin angefertigt worden. Man könnte an Stelle dieses auch ein solches aus Celluloid oder auch aus emaillierten Eisen anwenden; diese würden zwar nicht so zerbrechlich sein, aber schwerer rein zu halten und leichter von Chemikalien angegriffen.

D ist hohl, so dass der Rührer B durchgezogen und bei G befestigt werden kann. Das äussere Gefäss C wird soweit mit destilliertem Wasser gefüllt, damit das Niveau der inneren und äusseren Flüssigkeit gleich ist.

Wird nun der Apparat in Gang gebracht, so dreht sich der Cylinder A um seine Axe und durch diese Drehung wird bald auch das umgebende Wasser in gleicher Richtung in drehende Bewegung versetzt. Der Rührer B aber, der bei G befestig ist bewegt sich nicht sondern bleibt still stehen und da er unten, siehe Zeichnung, mit einer Anzahl seitlicher Schaufeln versehen ist, so bilden diese ein Hinderniss für die gleichmässige Vorwärtsbewegung der im Inneren befindlichen Lösung, bewirken aber hiedurch ein solches fortgesetztes Wirbeln und Durcheinandermischen ihrer einzelnen Bestandteile, dass während der ganzen Dauer der Dialyse immer neue Teilchen an die innere Oberfläche der grossen Membran gelangen und so die Dialyse selbst erheblich beschleunigen.

A. Versuche mit Presshefe.

Anfangs verwendete ich zur Invertindarstellung Presshefe die mir bereitwilligst von der Hefezuchtanstalt des Vereins der Spiritusfabrikanten in Deutschland, Berlin N, zur Verfügung gestellt wurde. Dieselbe hatte einen Wassergehalt von 75.9 %; 100 gr Trockensubstanz enthielten 8.67 % Asche.

Hefe I.

5 Kilo Hefe wurden mit 5 Liter 95 %igen Alkohols gut verrieben und einen Tag lang ruhig stehen gelassen. Sodann wurde der Alkohol durch Filtrieren entfernt und hierauf der Rückstand unter ständigem Umrühren mittelst

eines Rührwerks einige Tage lang mit 6 Liter Wasser bei Zimmertemperatur ausgezogen. Nach dieser Zeit wurde der Hefebrei auf mehrere Faltenfilter gebracht, um die wässerige Invertinlösung von der Hefe zu trennen. Es zeigte sich, dass die Hefezellen bei einmaliger Extraktion nicht alles wirksame Invertin an das Wasser abgeben, sondern dass ein grosser Teil des Enzymes von den Zellen zurückgehalten wird, der erst mit der Zeit durch die Zellmembran hindurchdiffundieren kann. Darum wurde die auf den Filtern zurückgebliebene Hefe noch mehrmals nacheinander unter Umrühren mit Wasser ausgezogen und die Filtrate aufgearbeitet. Die Zellen gaben bei dieser Behandlung immerwieder neues wirksames Invertin an das Wasser ab; man kann sogar nach monatelangen Ertrahieren eine Rohrzucker invertierende Lösung erhalten,[1]) aber die Invertinmenge wird immer kleiner.

Das erste invertinhaltige Filtrat wirkte stark invertierend, war gelb gefärbt, reagierte mit Lakmus amphoter, gab mit molybdensaurem Ammon eine starke Phosphorsäurereaktion und besass einen sehr angenehmen obstartigen Geruch. Zu dieser Lösung wurde zuerst etwas Ammoniak zugefügt, um einen grossen Teil der Phosphorsäure und der in der Lösung vorhandenen Magnesia als Ammonium-Magnesiumphosphat auszufällen. Als sich der Niederschlag abgesetzt, wurde zuerst durch Filtrierpapier, dann durch *Pukal*sche Tonfilter filtriert und zuletzt das ganz klare Filtrat im Vacuum bei einer nicht

[1]) Schon C. Nägeli und O. Löw (Liebigs Annalen d. Chem. 193. 1878 S. 322) beobachteten, dass aus der Hefe bei zwanzigtägigem Kochen mit Wasser, immer noch ein Schleim ausgesogen werden kann. Der gereinigten Substanz, die wohl mit dem Hefegummi von Salkowski identisch ist, kommt die Formel $C_{12}H_{22}O_{11}$ zu.

40° übersteigenden Temperarur bis zur Konsistenz eines dünnen Sirupes eingedampft. Dieser jetzt noch immer wirksame Sirup wurde zum Zwecke der Entfernung weiterer Phosphorsäuremengen nochmals mit Ammoniak im Überschusse versetzt, konnte aber erst nach einigen Tagen, nachdem sich die phosphorsaure Ammonmagnesia vollständig am Boden abgesetzt, klar filtriert werden. Das jetzt sehr wenig wirksame Filtrat, in dem das Invertin höchst wahrscheinlich durch das Ammoniak geschwächt wurde, ist 5 Tage lang dialysiert worden. Infolge dieser Behandlung mit Ammoniak pflegte die Lösung immer einen Teil ihrer Wirksamkeit zu verlieren.

Das Aussenwasser habe ich täglich einmal gewechselt. Die Wasser vom 1., 2. und 3. Tag waren alle gelb gefärbt, unwirksam, von ammoniakalischer Reaktion und reich an Phosphorsäure; die Wässer vom 4. und 5. Tag waren auch phosphorsäurehaltig, sehr schwach gefärbt, reagierten neutral und waren wirksam. Wie sich aus dem am Ende höheren Druck des Flüssigkeitsniveaus im Inneren des Dialysators gegenüber dem äusseren Flüssigkeitsniveau ergab, war die Pergamentmembran während der ganzen Dialyse nirgends lose geworden, man darf deshalb nicht befürchten, dass das Enzym durch irgend ein fremdes Loch oder einen freien Riss im Pergamentpapier in das Aussenwasser gelangt war, sondern man muss annehmen, dass es durch die Poren derselben hindurchdiffundiert.

Aus der Aussenflüssigkeit des 4. und 5. Tages wurde das Invertin, nach dem Eindampfen im Vacuum bis auf einige cc. bei ca. 35°, mit Alkohol absolutus ausgefällt, mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Das amorphe hellgelbe Pulver war sehr wirksam, gab keine

Biuretreaktion, reduzierte aber, nach dem Kochen mit Salzsäure und nach dem Neutralisieren der letzteren *Fehling*sche Lösung. Man sieht, dass die wirksame Gruppe ziemlich leicht mit dem Kohlenhydrat zugleich durch die Pergamentmembran hindurchgeht.

Die innere Flüssigkeit, welche durch die Dialyse wieder wirksamer geworden war, wurde gleichfalls im Vacuum bei 30—35° bis auf etwa 120 ccm eingedampft und aus ihr das Invertin mit absolutem Alkohol ausgefällt. Das Präparat war wirksam, etwas grau gefärbt und von amorpher Beschaffenheit.

Der zweite Hefeauszug war sehr wirksam und reagierte sauer. Das Filtrat, gegen 3 l, habe ich mit Ammoniak im Überschusse versetzt; nachdem von der phosphorsauren Ammoniakmagnesia abfiltriert wurde, ist im Vacuum bei 30—35° bis auf ca. 250 ccm eingedampft und das Invertin mit absolutem Alkohol ausgefällt worden. Das Präparat war unwirksam, wurde aber trotzdem in Wasser von 30° gelöst, nochmals mit Ammoniak versetzt und nach dem Filtrieren der Dialyse unterworfen. Das Dialysat habe ich täglich auf seine Wirksamkeit geprüft, es zeigte sich, dass dieses am 4. Tag, nachdem der grösste Teil des Ammoniaks entfernt war, wieder schwach wirksam wurde und die Wirksamkeit auch jeden Tag zunahm.

Auch der dritte Auszug war wie die ersten zwei sehr wirksam und reagierte sauer; wurde aber ohne Zusatz von Ammoniak im Vacuum bei 35° eingeengt. Aus der sirupösen Flüssigkeit wurde nach der Filtration das Invertin direkt ohne zu dialysieren mit absolutem Alkohol ausgefällt. Diesen Niederschlag (Rohinvertin), der neben Enzym noch Eiweissstoffe und Kohlenhydrate enthielt, rieb ich in einer Reibeschale mit lauwarmen Wasser

an, füllte den Brei in ein Becherglas und gab noch so viel von dem lauwarmen Wasser hinzu, bis die Flüssigkeit etwas dünnflüssiger wurde. Nach einigen Stunden, nachdem sich ein Schleim am Boden abgesetzt, wurde das ganze vorsichtig auf ein Faltenfilter gebracht, wobei nach dem Ablaufen ein grosser Teil durch Alkohol in Wasser unlöslich gemachter Eiweisskörper auf dem Filter zurückblieb. Um aus der Invertinlösung auch noch etwas Phosphorsäure und Magnesia zu entfernen, setzte ich derselben noch Ammoniak hinzu; die Flüssigkeit, die vordem wirksam war, ist aber nach dem Stehen über die Nacht unwirksam geworden. Nach dem Abfiltrieren des Ammonium-Magnesiumphosphats wurde 6 Tage dialysiert.

Der vierte Auszug wurde im Vacuum bei etwa 35° eingedampft, der Sirup mit absolutem Alkohol versetzt und der entstandene Niederschlag zuerst mit absolutem Alkohol, dann mit Aether gut gewaschen und zuletzt im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet. Dieses Präparat wurde mit dem aus dem ersten Auszuge durch Dialyse gereinigten vermischt, in lauwarmem Wasser gelöst, mit Ammoniak versetzt und nach dem Absitzen der phosphorsauren Ammoniak-Magnesia das Ganze filtriert. Das ammoniakalische Filtrat wurde im Vacuum etwas eingedampft, um die Hauptmenge des Ammoniaks möglichst rasch zu entfernen und dann dialysiert. Die zu dialysierende Flüssigkeit reagierte von der Dialyse alkalisch und erwies sich als unwirksam, wurde aber, nachdem ich es einige Tage der Dialyse unterworfen, von Neuem wirksam befunden.

Nachdem der zweite Auszug 8 Tage, der dritte 6 Tage, der vierte und erste 5 Tage der Dialyse unterworfen gewesen, wurden die Dialysate aller vier Auszüge vermengt, um zusammen weiter dialysiert zu werden.

Beim Zusammenmischen wurde das Enzym wieder unwirksam, das ist aber dadurch zu erklären, dass der dritte Auszug noch freies Ammoniak enthielt, durch welches das Invertin der ganzen Mischung unwirksam wurde. Erst nach einigen Tagen Dialyse kehrte die Wirksamkeit wieder zurück. Nach 8 Tagen wurde die Dialyse unterbrochen und aus der inneren Flüssigkeit nach der Fällung mit Alkohol ein leichtes, lockeres, grauweisses wirksames Pulver erhalten.

Die Ausbeute dies aus 5 kg Hefe erhaltenen gereinigten Invertinpräparates betrug 3.1 g.

Die Analyse ergab Folgendes:

I. Aschenbestimmung:

a) 1.8686 g trockener Substanz hinterliessen 0.0374 g Asche = 2.03 %,

b) 0.0379 g Asche enthalten 0.0309 g P_2O_5, entsprechend 81,54 % P_2O_5 oder 35.60 % P.

Daraus berechnet sich für 100 g Invertin 1.65 g P_2O_5 oder 0.72 g P.

II. Elementaranalyse:

0.1985 g trockener Substanz mit 0.0039 g Asche, lieferten 0.317 g CO_2 und 0.1195 g H_2O = 44.54 % C und 6.86 % H in aschenfreier Substanz,

0.2687 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.01095 g N = 4.16 % N in aschenfreier Substanz.

Über die Ausführung dieser und aller noch folgenden Analysen sei noch nachstehendes erwähnt:

Die Substanz wurde immer zuerst mit etwas Kaliumdichromat vermischt und dann erst im Schiffchen verbrannt.

Die Aschenbestimmungen wurden, wie es schon *Kölle* angegeben, nach der Methode von *Strecker*[1]) ausgeführt.

Es wurden nämlich 1 – 2 g der trockenen Substanz im Porzellantiegel vorsichtig verkohlt, nach dem Abkühlen setzte ich soviel einer konzentrierten Baryumhydroxydlösung von genau bekannten Gehalt, dass etwa die Hälfte mehr BaO vorhanden war, als die in der Asche vorhandene Phosphorsäure zu binden vermochte, dampfte die Lösung auf dem Wasserbade ein und erhitzte endlich 8 – 10 Stunden bei schwacher Rotglut in der Muffel. Die Asche wurde dann mit etwas Ammoniumcarbonat befeuchtet, um etwa ungebundenes BaO in $BaCO_3$ überzuführen und noch ca. 1 Stunde in der Muffel schwach erhitzt. Zum Schluss wurde das Ganze gewogen und in der Gesamtasche die Kohlensäure nach *Kolbe*[2]) bestimmt. Wird nun die gefundene Kohlensäure und die bekannte Menge des zugesetzten Baryumoxydes vom Gesamtgewicht abgezogen, so erfährt man das Gewicht der reinen Asche.

Hefe II.

5 kg dieser Hefe wurden wie Hefe I zuerst mit Alkohol behandelt und dann verschiedene Male mit Wasser ausgezogen.

Erster Auszug: Die stark wirksame hellgelbe, mit Lakmus amphoter reagierende Flüssigkeit wurde, nachdem sie im Vacuum bei ca. 35^0 bis zur Konsistenz eines dünnen Sirupes eingedampft war mit der acht- bis zehnfachen Menge absoluten Alkohols versetzt. Der aus-

[1]) Liebigs Annalen. Bd. 73. S. 366.

[2]) Fresenius, Quant. Anal. I. 6. Auflage. S. 449.

geschiedene Niederschlag von Rohinvertin wurde nach dem Abfiltrieren in lauwarmem Wasser gelöst, von den unlöslichen Eiweissstoffen wurde abfiltriert und zum Filtrat Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzugefügt. Die nach dem Abfiltrieren von der ausgeschiedenen phosphorsauren Ammoniak-Magnesia befreite Lösung, wurde sodann 24 Tage ununterbrochen dialysiert.

Während dieser Zeit habe ich die Aussenflüssigkeit, gewöhnlich 6—7 l täglich ein- bis zweimal gewechselt und auf Phosphorsäure geprüft; zuletzt konnte die Phosphorsäure erst nach dem Eindampfen von über 500 ccm des Aussenwassers nachgewiesen werden, aber es gelang mir nicht, dieselbe durch Dielyse vollkommen zu entfernen, da mit der Phosphorsäure auch immer sehr viel von der wirksamen Substanz durch die Membran hindurchging. Nach der Dialyse ist aus dem Inhalt des Dialysators, nach vorherigem Eindampfen auf ein kleineres Volumen im Vacuum bei 35—40° das Invertin mit viel absoluten Alkohol ausgefällt worden und dieses aufs Filter gebracht zuerst mit Alkohol absolutus, darauf mit wasserfreiem Aether ausgewaschen. Der im Vacuum über Schwefelsäure getrocknete Niederschlag, stellte eine lockere zu einem Pulver zerreibbare grauliche Masse dar, die in der Tat auch ein sehr starkes Inversionsvermögen besass.

Die Zusammensetzung des Präparates war folgende:

I. Aschenbestimmung:

a) 2.3757 g trockener Substanz hinterliessen 0.0429 g Asche = 1.80 %,

b) 0.0429 g Asche enthalten 0.0354 g P_2O_5, entsprechend 82.70 % P_2O oder 36.11 % P.

Daraus berechnet sich für 100 g Invertin 1.49 g P_2O_5 oder 0.65 g P.

II. Elementaranalyse:

0.2195 g trockener Substanz mit 0.0039 g Asche, lieferten 0.3571 g CO_2 und 0.1372 g H_2O = 45.17 % C und 7.13 % H in aschenfreier Substanz,

0.4268 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.009345 g N = 2.23 % N in aschenfreier Substanz.

Die folgenden drei Auszüge waren alle wirksam und blieben es auch bis nach dem Eindampfen im Vacuum, das Invertin verlor aber merkwürdigerweise nach der darauffolgenden Fällung mit Alkohol immer seine Wirksamkeit.

Um dies Übel zu beseitigen, versuchte ich Verschiedenes. Zuerst kürzte ich die Behandlung mit Alkohol ab, trotzdem man sonst das Invertin ganz ruhig bei Zimmertemperatur einen Tag lang mit absolutem Alkohol in Berührung lassen kann, ohne dass die enzymatische Kraft dabei merklich abgenommen hätte. Eine kleine Portion eines wirksamen Invertinextraktes wurde mit absolutem Alkohol gefällt, nach einer halben Stunde filtriert, mit Alkohol und Aether nachgewaschen und im Vacuum getrocknet. Sodann löste ich etwas vom Niederschlag in einer 1 %igen Rohrzuckerlösung auf, fand aber, dass die Zuckerlösung auch nicht nach längerer Zeit invertiert wurde. Die ganze Operation, von der Fällung mit Alkohol an, bis zum Aufbewahren im Exsiccator, dauerte nicht einmal eine Stunde und das Enzym ist somit nur durch die kurze Berührung mit Alkohol unwirksam geworden. Der Alkohol und Aether, der dazu benützt worden, war vollkommen rein, reagierte also auch

ganz neutral, sodass das Unwirksamwerden nicht auf eine Verunreinigung des Fällungsmittels zurückzuführen ist. Ein kleiner Teil desselben Invertinextraktes, den ich nicht mit Alkohol behandelte, sondern mit Toluol ruhig stehen liess, war noch nach 8 Tagen wirksam.

Ich versuchte auch, das Invertin mit Aceton aus der wässerigen Lösung auszufällen. Zu diesem Zweck wurde ein Teil der konzentrierten Invertinlösung mit 5—6 Teilen reinen Acetons versetzt; es bildete sich auch sofort eine Trübung und bald darauf ein gelbweisser voluminöser Niederschlag, der nach dem Waschen mit Aceton und Trocknen im Vacuum eine rotbraune Farbe und eine etwas harzige Beschaffenheit annahm. Das Präparat war wirksam, blieb es aber nur vier Tage lang.

In der nachstehenden Tabelle sind ausser den ersten zwei bereits mitgeteilten Analysen, zum Vergleich noch Analysen zweier aus derselben Hefeart dargestellte Invertinpräparate angeführt, die Dr. *Höpfner,* Assistent am hiesigen Laboratorium, vor zwei Jahren dargestellt und analysiert hatte. Auffallend ist es, dass alle diese Präparate einen viel kleineren Stickstoffgehalt aufweisen, als die bisherigen von *Barth, Osborne, Kölle* und *Salkowski.*

Präparat	Asche %	C %	H %	N %	
I	2.03	44.54	6.86	4.16	Der Prozentgehalt an C, H und N ist auf aschenfreie Substanz berechnet.
II	1.80	45.17	7.13	2.23	
III *)	4.36	44.18	6.66	4.26	
IV *)	2.70	44.77	6.25	4.16	

*) Diese Analysen wurden von Dr. Höpfner ausgeführt.

Wie schon früher angegeben, stammt die verwendete Presshefe aus einer Hefezuchtanstalt, wo die Bedingungen zu ihrer Entwickelung die möglichst besten waren, unter anderen eine von fremden Mikroorganismen gänzlich befreite Luft. Es ist höchst wahrscheinlich, dass die Hefe durch diese gute Behandlung etwas empfindlicher gegen schädliche Einflüsse wird, als eine nicht unter so guten Bedingungen gezüchtete; möglicherweise ist das der Grund, warum die Invertinextrakte gegen Alkohol und Ammoniak so auffallend empfindlich waren.

Es ist ja auch eine durch Erfahrung festgestellte Tatsache, dass bei jeder in einen Betrieb, Brauerei oder Brennerei, eingeführten neuen Hefemasse, eine gewisse Zeit verlaufen muss, ehe die Hefe auf dieselbe Weise arbeitet wie die gewöhnliche Praxishefe; sie muss sich erst an die Verhältnisse angewöhnen, sie muss akklimatisiert werden. Die Bierhefe ist ja in der Praxis allen möglichen schädlichen Einflüssen und Infektionen ausgesetzt, sie muss deshalb, um weiter zu kommen, eine gewisse Wiederstandsfähigkeit besitzen. Ich verwendete daher für meine weiteren Versuche untergärige Bierhefe, in der Hoffnung, aus solchem Ausgangsmateriale Invertinpräparate zu gewinnen, die von Alkohol und Ammoniak nicht so stark geschädigt würden.

B. Versuche mit untergäriger Bierhefe.

Die Brauerei *Heinrich* in Lustnau bei Tübingen war so freundlich, mir einigemale die nötige Menge möglichst reiner Bierhefe und in den Sommermonaten das reinste Kunsteis mit dankenswerter Bereitwilligkeit zur Verfügung zu stellen.

Darstellung von Rohinvertin.

Zur Darstellung von Rohinvertin verwendete ich im Prinzip die Methode von *Osborne*, welche ich aber in nachstehender Weise modifizierte.

Frische untergärige Bierhefe wird durch Sieben und waschen mit kaltem Wasser (1—3°) von den Bestandteilen der vergorenen Bierwürze gereinigt und durch Abnutschen vom anhaftenden Wasser möglichst befreit. Die auf diese Art gereinigte und gewonnene Hefe hatte eine weissgelbliche Farbe, schwachen Geruch und enthielt 75—80 % Wasser. In angegebener Weise vorbereitete Hefe, wird mit dem gleichen Gewicht 96 %igen Alkohols übergossen und nachdem man das Ganze zu einem gleichmässigen Brei angerieben, 12—24 Stunden ruhig stehen gelassen. Alsdann wird der Alkohol durch Papierfilter, oder was noch besser, durch ein Flanelltuch entfernt, die rückständige Masse mit dem doppelten Gewicht Wasser unter Zusatz von etwas Toluol (ca. 15 gr auf Lit.) angerührt und der Brei zwei bis drei Tage lang unter häufigen Umrühren bei einer ziemlich niedrigen Temperatur (1—5°) erhalten. Am Ende bringt man den Hefebrei auf mehrere Faltenfilter, (die Filtration geht sehr langsam von statten), und wenn die Flüssigeit aus diesen nicht ganz klar abläuft, so wird die Filtration unter Zusatz von etwas spanischer Erde wiederholt. Das filtrierte wässerige Extrakt stellt am Ende eine gelbe Flüssigkeit dar, welche einen starken, angenehm aromatischen Geruch besitzt.

Das ganz klare Filtrat dampft man sodann im Vacuum vorsichtig bei einer nicht 40° übersteigender Temperatur bis zur Kosistenz eines dünnen Sirupes ein, giesst die Flüssigkeit in ein Becherglas, kühlt gut ab

und filtriert nach dem Absitzen der ausgeschiedenen Stoffe. (Eiweiss und Salze).

Den eingedampften und filtrierten braunen Hefeauszug verarbeitet man dann in kleinen Portionen weiter auf folgende Weise: Zu 50 ccm des Extraktes werden in einem 500 ccm fassenden Becherglase unter fortwährendem Umschwenken 50 oder mehr ccm absoluten Alkohols langsam zugesetzt, bis die Flüssigkeit eben trübe oder milchig wird, ohne dass sich dabei weisse Flocken ausscheiden; dann giesst man wenigstens noch 300 ccm absoluten Alkohols dieser Mischung sogleich auf einmal hinzu, schwenkt einmal um und lässt nur einige Minuten ruhig stehen, bis sich eben die Hauptmenge in Gestalt weisser oder gelber Flocken abgesetzt hat, giesst den überstehenden noch milchigen Alkohol ab und und übergiesst den Niederschlag nochmals mit 200 bis 300 ccm absoluten Alkohols. Man vermeide bei dieser Operation jeden Glasstab, weil sich sonst das Invertin als eine klebrige Masse an demselben festhält, welche getrocknet bald unwirksam wird. Es ist ratsam, das ausgeschiedene Rohinvertin noch ein- bis zweimal mit kleinen Mengen absoluten Alkohols zu übergiessen und erst, wenn der Niederschlag nach einiger Zeit durch Stehen unter Alkohol die weiche Konsistenz verloren und eine festere Form angenommen hat, bringt man ihn auf die Filter, wäscht mit absolutem Alkohol und wasserfreiem Aether aus und entfernt den überschüssigen Aether durch Absaugen. Die Reste abgegossenen Alkohols werden zusammengegossen und kühl gestellt, worauf sich nach einigen Stunden noch eine ziemliche Menge Invertin ausscheidet, das nach dem Auswachen mit absolutem Alkohol und Aether mit dem ersten Präparat vereinigt werden kann. Nach dem Trocknen im Vacuum und über conc.

Schwefesäure zeigt sich das genau auf diese Weise dargestellte Rohinvertin, als ein ausserordentlich wirksames, weisses oder höchstens gelbliches, lockeres Pulver ohne jede harzige oder hornartige Beimengung.

Es lohnt sich, die extrahierte Hefe noch einigemal mit Wasser auszuziehen, um aus den neuen Extrakten neue Portionen Invertins zu gewinnen.

Zu obiger Vorschrift sei noch Folgendes bemerkt Übergiessen der Hefe mit Alkohol vor der Extraktion mit Wasser, hat erstens den Zweck die Hefe zu töten, — denn tote Hefe gibt was schon *Hoppe-Seyler* gefunden hat, ihr Invertin an das Wasser ab, — und zweitens den, bereits im Anfang einen grossen Teil der Eiweisskörper zu coagulieren und sie dadurch in Wasser entweder schwerlöslich oder ganz unlöslich zu machen.

Ferner habe ich beobachtet, dass es viel besser ist, die Hefe bei möglichst niedriger Temperatur auszuziehen. Invertin ist auch im kalten Wasser sehr leicht löslich, man erhält deshalb dieselbe Menge Enzym wie bei der Extraktion bei höherer Temperatur, dagegen viel weniger Eiweissstoffe und deren Zersetzungsprodukte, wie Leucin und Tyrosin, da die proteolytischen Enzyme, die in der Hefe vorkommen, bei niederer Temperatur sehr langsam oder garnicht wirken. Aus toter Hefe diffundiert das Invertin sehr rasch und dieser Umstand gestattet die Dauer der Extraktion mit Wasser bedeutend abzukürzen. Ich bemerkte verschiedene Male, dass tote Hefe schon nach 15 Minuten sehr viel Invertin an das Wasser abgab.

Das zuerst von *E. Fischer* empfolene Toluol wird dem Wasser, trotzdem bei der niederen Temperatur die Bakterien nur schwer fortkommen, als Konservierungsmittel zugesetzt; es verhält sich dem Invertin gegenüber

ganz indifferent und ist auch namentlich deshalb dem Chloroform vorzuziehen, weil es als specifisch leicht an der Oberfläche des Wassers schwimmt, wodurch eine für Spaltpilze undurchlässige Schicht gebildet wird. Hefeextrakt ist bekanntlich ein ausgezeichneter Nährboden für Spalt- und Schimmelpilze; man achte daher darauf, dass in den Flüssigkeiten Toluol immer in genügender Menge vorhanden ist. Besonders ist diese Vorsicht bei längeren Filtrationen nötig und bei den Arbeiten im Sommer.

Will man ein sehr schönes helles Präparat erhalten, so bringe man den Invertinniederschlag nicht auf ein, sondern auf mehrere kleine Filter; es ist auf diese Weise leichter mit Alkohol auszuwaschen und schneller trocken zu saugen. Überhaupt müssen alle Operationen bei der Invertinbereitung mit möglichster Schnelligkeit ausgeführt werden, weil sonst die Wirksamkeit des Präparates eine erhebliche Einbusse erleidet. Man soll auch zur Fällung sowie zum Auswaschen des Invertins immer nur absoluten Alkohol verwenden. Durch übertriebenes Sparen oder Anwendung von 96 % Alkohol werden die Präparate klebrig, nehmen nach einiger Zeit im Exsiccator eine harzige Beschaffenheit an und werden damit bald auch unwirksam.

Nach diesem Verfahren verarbeitete ich nach einander vier verschiedene Portionen Bierhefe auf Rohinvertin; und dabei wurde jede einzelne Portion 3 bis 4 mal mit Wasser ausgezogen. Ich will die einzelnen Hefeportionen als Hefe I, II, III und IV bezeichnen.

Einen Begriff von der Grösse der Ausbeute mögen folgende Daten geben.

10 Kilo der Hefe I wurden viermal mit Wasser ausgezogen und lieferten im ersten Auszug 268 g, im

zweiten 83 g, im dritten 90 g, und im vierten 65 g Rohinvertin. 15 Kilo der Hefe III gaben im ersten Auszug 225 g und 5 Kilo der Hefe IV im ersten Auszug 96 g.

In einigen dieser Rohpräparate bestimmte ich den Aschen- und den Stickstoff-Gehalt; in der Asche auch die Menge der Phosphorsäure.

Analysen der Rohinvertine.

Hefe I.

I. Aschenbestimmung.

Invertin aus dem I. Auszug:

a) 0.7511 g trockener Substanz hinterliessen 0.2695 g Asche = 35.40 %.

b) 0.2695 g Asche enthalten 0.1734 g P_2O_5, entsprechend 64.36 % P_2O_5 oder 28.10 % P.

Invertin aus dem II. Auszug:

a) 0.8215 g trockener Substanz hinterliessen 0.1879 g Asche = 22.87 %.

b) 0.1879 g Asche enthalten 0.1465 g P_2O_5, entsprechend 77.91 % P_2O_5 oder 34.01 g P.

Invertin aus dem III. Auszug:

a) 0.9340 g trockener Substanz hinterliessen 0.1337 g Asche = 14.31 %.

b) 0.1337 g Asche enthalten 0.0624 g P_2O_5, entsprechend 46.67 % P_2O_5 oder 20.37 % P.

Invertin aus dem IV. Auszug:

a) 0.8885 g trockener Substanz hinterliessen 0.1065 g Asche = 11.98 %.

b) 0.1065 g Asche enthalten 0.0782 g P_2O_5, entsprechend 73.42 % P_2O_5 oder 32.05 % P.

II. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl:

Invertin aus dem I. Auszug:

0.6204 g trockener Substanz gaben 0.05155 g N = 12.86 % N in aschenfreier Substanz.

Invertin aus dem II. Auszug:

0.3514 g trockener Substanz gaben 0.032025 g N = 11.81 % N in aschenfreier Substanz.

Invertin aus dem III. Auszug:

0.1843 g trockener Substanz gaben 0.020125 g N = 12.73 % N in aschenfreier Substanz.

Invertin aus dem IV. Auszug:

0.5186 g trockener Substanz gaben 0.057225 g N = 12.53 % N in aschenfreier Substanz.

Hefe II.

Aschenbestimmung.

Invertin aus dem I. Auszug:

1.2630 g trockener Substanz hinterliessen 0.3707 g Asche = 29.35 %.

Invertin aus dem II. Auszug:

a) 1.0520 g trockene Substanz hinterliessen 0.2067 g Asche = 1965 %

b) 0.2067 g Asche enthalten 0.1323 g P_2O_5, entsprechend 64.01 % P_2O_5 oder 27.94 % P.

Hefe III.

I. Aschenbestimmung.

Invertin aus dem I. Auszug:

a) 1.3531 g trockener Substanz hinterliessen 0.4389 g Asche = 32.43 %.

b) 0.4389 g Asche enthalten 0.2579 g P_2O_5, entsprechend 58.77 % P_2O_5 oder 25.17 % P.

II. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl:

Invertin aus dem I. Auszug:

0,4545 g trockener Substanz gaben 0,03314 g N = 10.79 % N in aschenfreier Substanz.

Hefe IV.

I. Aschenbestimmung.

Invertin aus dem I. Auszug:

a) 0.6420 g trockener Substanz hinterliessen 0.2353 g Asche = 36.65 %.

b) 0.2353 g Asche enthalten 0.1617 g P_2O_5, entsprechend 68.72 % P_2O_5 oder 30.00 % P.

Invertin aus dem II. Auszug:

a) 0.7742 g trockener Substanz hinterliessen 0.2534 g Asche = 32.73 %.

b) 0.2534 g Asche enthalten 0.1973 g P_2O_5, entsprechend 77.83 % P_2O_5, oder 33.98 % P.

II. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl:

Invertin aus dem I. Auszug:

0.1753 g trockener Substanz gaben 0.01389 g N = 12.51 % N in aschenfreier Substanz.

Invertin aus dem II. Auszug:

0.5173 g trockener Substanz gaben 0.04256 g N = 12,23 % in aschenfreier Substanz.

In nachstehender Tabelle sind die hier angeführten Resultate der Analysen übersichtlich zusammengestellt.

Präparat aus:	Asche, Prozentgehalt	100 g Asche enthalten Gramme:		100 g des Präparates enthalten G:		Stickstoff, Prozentgehalt in aschenfreier Substanz.
		P_2O_5	oder P	P_2O_5	oder P	
Hefe I ersten Auszug	35.40	64.36	28.10	22.78	9.94	12.86
„ zweiten „	22.87	77.91	34.01	17.83	7.78	11.81
„ dritten „	14.31	46.67*	20.37*	6.67	2.91	12.73
„ vierten „	11.98	73.42	32.05	8 79	3.83	12.53
Hefe II ersten Auszug	29.35	—	—	—	—	—
„ zweiten „	19.65	64.01	27.94	12.59	5.49	—
Hefe III ersten Auszug	32.43	58.77	25 17	19.04	8.29	10.79
Hefe IV ersten Auszug	36.65	68.72	30.00	25.18	10.99	12.51
„ zweiten „	32.73	77.83	33.98	25 47	11.12	12.23

* Hier scheint ein Fehler der Analyse vorzuliegen.

Man sieht, dass alle diese Rohinvertine noch sehr aschenhaltig sind, besonders die aus dem ersten Auszug einer Hefe hergestellten Präparate. Bei weiterer Extraktion mit Wasser nimmt der Aschengehalt ab.

Extraktion der Hefe mit verdünnter Magnesia-Mixtur.

Um den Phosphorgehalt, der ja zum grössten Teil an Kalium und Magnesium gebunden ist, herabzudrücken und um zugleich zu prüfen, ob meine Bierhefe gegen Ammoniak auch so stark empfindlich sei wie die zuerst verwendete Presshefe, versuchte ich etwas Hefe mit Wasser, dem etwas Magnesiamixtur zugefügt war, zu extrahieren.

Zwei Kilo der gereinigten und gewaschenen Bierhefe II wurden mit zwei Liter Alkohol von 96 % übergossen, über die Nacht stehen gelassen und am anderen Tage durch Filtrieren von der Flüssigkeit getrennt. Die zurückgebliebene Hefe wurde mit 1500 ccm Wasser,

dem 250 ccm Magnesiamixtur[1]) zugefügt waren. 5 Tage lang extrahiert, alsdann das Extrakt der Hefe abfiltriert. Die ganz klare, nach Ammoniak riechende Flüssigkeit invertierte, wenn man nicht zuviel von ihr anwandte, eine Rohrzuckerlösung sehr stark. Nahm man aber zur Inversion des Rohrzuckers etwas mehr vom Extrakt, so dass die Zuckerlösung stark nach Ammoniak roch, so konnte nach dem Kochen mit *Fehling*scher Lösung keine Kupferreduktion beobachtet werden, was durch die Löslichkeit des Cu_2O in Ammoniak leicht zu erklären ist. Das im Vakuum unter 40° von Ammoniak befreite und auf 150 ccm eingedampfte Hefeextrakt wurde wie gewöhnlich mit absolutem Alkohol im grossen Überschuss versetzt, der Niederschlag mit Alkohol gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Der Heferückstand wurde darauf nochmals, zuerst mit 200 ccm Magnesiamixtur und 1500 ccm Wasser, alsdann noch einmal mit 100 ccm Magnesiamixtur und 1 Liter Wasser ausgezogen. Diese beiden Extrakte wurden im Vakuum unter 40° von Ammoniak befreit, zur Sirupdicke eingedampft, mit Alkohol gefällt, die Niederschläge gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute an Substanz, die trotz Ammoniakbehandlung merkwürdigerweise jedesmal ihre Wirksamkeit bewahrt hatte, betrug beim I. Auszug 20.2 g, beim II. Auszug 23.3 g und beim III. Auszug 30.0 g.

---

[1]) 100 g Chlormagnesium und 140 g Chlorammonium werden in 1300 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit Ammoniak von spec. Gewicht 0.96 zu 2 l aufgefüllt.

Analyse.

I. Aschenbestimmung.

Präparat I:

a) 0.8303 g trockener Substanz hinterliessen 0.0648 g Asche = 7.80 %

b) 0.0648 g Asche enthalten 0.0509 g P_2O_5, entsprechend 78.59 % P_2O_5 oder 34.31 % P.

Präparat II:

a) 0.8715 g trockener Substanz hinterliessen 0.1583 g Asche = 18.16 %.

b) 0.1583 g Asche enthalten 0.0875 g P_2O_5, entsprechend 55.27 % P_2O_5 oder 24.13 % P.

Präparat III:

a) 0.6420 g trockener Substanz hinterliessen 0.1446 g Asche = 22.52 %.

b) 0.1446 g Asche enthalten 0.0885 g P_2O_5, entsprechend 59.12 % P_2O_5 oder 25.81 % P.

II. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

Präparat I:

0.3957 g Substanz gaben 0.04466 g N = 12.24 % in aschenfreier Substanz.

Präparat II:

0.2364 g Substanz gaben 0.02758 g N = 14.25 % in aschenfreier Substanz.

Präparat III:

0.1891 g Substanz gaben 0.02184 g N = 14.88 % in aschenfreier Substanz.

Tabellarisch zusammengestellt:

Invertin aus dem Auszug.	Asche, Prozentgehalt	100 g Asche enthalten G: oder P_2O_5	oder P	100 g des Präparates enthalten G: oder P_2O_5	oder P	Stickstoff, Prozentgehalt in aschenfreier Substanz
I	7.80	78.59	34.31	6.13	2.67	12.24
II	18.16	55.27	24.13	10.03	4.38	14.25
III	22.52	59.12	25.81	13.13	5.73	14.88

Man sieht, dass der erste Auszug am wenigsten Asche enthält, die Menge zugesetzter Magnesia und diejenige der in der Hefe enthaltenen phosphorsauren Salze standen zu einander offenbar gerade in einem günstigen Verhältnis um das unlösliche Ammoniummagnesiumphosphat zu bilden. Im zweiten Auszug ist der Aschengehalt höher und im dritten noch grösser, da die zugesetzte Magnesia schon im Überschuss verhanden ist. Der Phosphorsäuregehalt des II. und III. Präparates wird in Wirklichkeit auch etwas höher sein als die Zahlen zeigen; er ist nämlich durch die beigemischte Magnesia herabgedrückt werden.

Reinigung des Rohinvertins durch Dialyse.

I. 100 g Rohinvertin aus Bierhefe I (I. Auszug), wurden mit wenig lauwarmen Wasser in einer Reibschale angerieben, dann längere Zeit in einem Becherglase mit 200 ccm Wasser digeriert und endlich, nachdem sich das Unlösliche abgesetzt hatte, wurde die Flüssigkeit vom Niederschlage abfiltriert. Das Filtrat wurde mit soviel Ammoniak, dass es stark danach roch, versetzt. Es bildete sich ein Niederschlag von Ammoniummagnesiumphosphat der abfiltriert wurde. Das klare

dunkelbraun gefärbte Filtrat wurde hierauf 12 Tage lang in dem oben beschriebenen Apparat ununterbrochen der Dialyse unterworfen. Nach dieser Zeit wurde der Inhalt der Membran im Vakuum unter 40° auf 150 ccm eingedampft, nach dem Abkühlen und Absitzen filtriert und aus dem Filtrat das Invertin mit viel absolutem Alkohol niedergeschlagen. Das ausgeschiedene Invertin stellte, nachdem es mit Alkohol ausgewaschen und im Vakuum getrocknet worden, ein leichtes, hellgrau gefärbtes stark wirksames amorphes Pulver dar, — das ich als Invertin Nr. 1 bezeichnen will. —

Die Analyse gab:

I. Aschenbestimmung.

a) 0.9784 g trockener Substanz hinterliessen 0.1453 g Asche = 14.86 %.

b) 0.1453 g Asche enthalten 0.1205 g P_2O_5 entsprechend 82.93 % P_2O_5 und 36.20 % P.

II. Elementaranalyse.

1. 0.2286 g trockener Substanz mit 0.0339 g Asche lieferten 0.1303 g H_2O und 0.3415 g CO_2 = 47.83 % C und 7.48 % H in aschenfreier Substanz.
2. 0.2074 g trockener Substanz mit 0.0308 g Asche lieferten 0.1158 g H_2O und 0.3079 g CO_2 = 47.56 % C und 7.33 % H in aschenfreier Substanz.
   0.1803 g trockener Substanz gaben nach Kjeldahl 0.0113 g N = 7.36 % in aschenfreier Substanz.

II. 250 gr Rohinvertin wurden in einer Reibschale mit 200 cc Wasser gut verrieben, der Brei in ein Becherglas übergossen, mit Wasser auf 500 ccm verdünnt und absitzen gelassen. Nach 12 Stunden hatte sich am Boden des Becherglases eine schleimige Substanz abgesetzt,

von der abfiltriert wurde. Die filtrierte Invertinlösung wurde solange mit Ammoniak versetzt, als sich noch ein Niederschlag bildete. Nachdem von der phosphorsauren Ammoniak-Magnesia abfiltriert worden, unterwarf ich das Filtrat der Dialyse, setzte diese 5 Tage lang fort, während welcher Zeit ich das Aussenwasser täglich erneuerte und es vom 2. Tage ab gleichfalls im Vakuum bei 35° einengte.

Nachdem die Dialyse am 5. Tage unterbrochen worden, wurde die innere Flüssigkeit im Vakuum auf ca. 150 ccm eingedampft, filtriert und aus ihr das Invertin mit viel absol. Alkohol niedergeschlagen. Die Ausbeute des hellgrauen leichten, stark wirksamen Pulvers betrug 32 g, es wurde als Invertin Nr. 2 bezeichnet.

Die gelbgefärbten Aussenwässer stellten nach dem Eindampfen im Vacuum unter 40° ein dunkelbraunes Extrakt dar, das gleichfalls wirksam war, aber zugleich natürlich sehr reich an Salzen. Aus diesem Extrakt konnte man mit Alkohol überhaupt kein Invertin in Pulverform mehr ausscheiden. Wenn man Alkohol im grossen Überschuss zufügte, so setzte sich am Boden des Becherglases eine harzig ölige Masse ab, die sogar bei längeren Stehen unter Alkohol nicht fest wurde. Dieser Bodensatz besas ein erstaunliches Inversionsvermögen, ein Tropfen davon wirkte bei Zimmertemperatur (18°) in einer 1 ½ %igen Rohzuckerlösung so rasch, dass man bereits nach einer halben Minute mit *Fehling*'scher Lösung die Anwesenheit von Invertzucker konstatieren konnte. Da ich aus dieser halbflüssigen Masse durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Fällen mit Alkohol keine pulverige Substanz erhalten konnte, wurde dieselbe in eine grosse Krystallisier-Schale gegossen und 15 Tage im Vakuum über conc. Schwefelsäure sich selbst

überlassen. Trotzdem trocknete sie nicht ein und es schied sich auch gar nichts aus. Es lag nahe, die Ursache hievon in der Gegenwart der grossen Menge anorganischer Salze (aus 250 gr Rohinvertin) in suchen. Deshalb habe ich die ölige Masse mit 50 ccm Wasser aufgenommen und nochmals, aber nur kurze Zeit (10 Stunden) der Dialyse unterworfen, habe aber während dieser Zeit das Aussenwasser 4 mal gewechselt. Auf diese Weise konnte in der Tat eine grosse Menge Salz entfernt werden, nur ging mir freilich gleichzeitig auch ziemlich viel Enzym verloren. Doch fiel aus der Innenflüssigkeit nach Zusatz von viel absol. Alkohol eine flockige Masse aus, die in der Tat das gesuchte Enzym darstellte. Um es trocken zu gewinnen, wurde der Alkohol nach kurzer Zeit abgegossen, der Niederschlag noch einmal mit absol. Alkohol übergossen und über die Nacht stehen gelassen. Am anderen Morgen wurde abfiltriert und der Niederschlag auf dem Filter mit Alkohol und Äther nachgewachsen. Die Ausbeute an dem trockenen, lichtbraunen pulverigen und wirksamen Präparate, welches ich als Invertin Nr. 2 a bezeichne, betrug 7,5 gr.

Um zu erfahren, ob dieses Invertin das sich als ziemlich diffusibel erwiesen hatte, beim Kochen mit verd. Säure auch Mannose als Spaltungsprodukt liefere habe ich 2 gr des Pulvers in einem mit einen Rückflussrohr versehenen Kochkolben 12 Stunden lang mit 30 ccm 5%iger Schwefelsäure auf dem Drahtnetze gekocht, alsdann die Lösung von der ausgeschiedenen Trübung abfiltriert und nach dem Verdünnen mit Wasser auf dem Wasserbade so lange mit frisch gefälltem, aufgeschwemmten Baryumcarbonat digeriert, bis die Reaktion neutral geworden war. Nachdem auch vom gebildeten Baryumsulfat und vom Überschusse des Baryumcarbonats

abfiltrirt war, wurde der weisse Niederschlag mit warmen Wasser gut ausgewaschen, das Filtrat sammt Waschwasser im Vakuum bis zu einem geringen Volumen eingedampft und in den Rest die 6 fache Menge Alkohol eingegossen. Nachdem das Ganze über die Nacht ruhig gestanden, wurde von Neuem filtriert, wobei noch etwas nachträglich ausgeschiedenes Baryumsalz auf dem Filter zurückblieb. Das alkoholische Filtrat wurde wieder im Vakuum zum Sirup eingedampft und aus dem Sirup nach Zusatz von 5 ccm Phenylhydrazin und Essigsäure ein Hydrazon gefällt. Nach dem Umkrystallisieren aus heissem verd. Alkohol stellte es rötliche Krystalle dar, deren Schmelzpunkt bei 195°—198° lag, also mit dem der Mannose identisch war.

Die Analyse der 2 Invertinpräparate ergab Folgendes:

Invertin Nr. 2, aus der inneren Flüssigkeit.

I. Aschenbestimmung.

9.4148 g trockener Substanz hinterliessen 0.6726 g Asche = 7.14 %. In 0.6352 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.4747 g	=	74.74 %
SO_3	0.0444 g	=	6.99 %
K_2O	0.0955 g	=	15.03 %
MgO	0.0105 g	=	1.65 %
			98.41

Ausserdem noch etwas Kalium und Spuren Eisen.

II. Elementaranalyse.

1. 0.2073 g trockener Substanz mit 0.0148 g Asche lieferten 0.1370 gr H_2O und 0.3196 g CO_2 = 45.28 % C und 7.96 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.1954 g trockener Substanz mit 0.0139 g Asche lieferten 0.1255 gr H_2O und 0.3015 g CO_2 = 45.65 % C und 7.79 % H in aschenfreier Substanz.

0.3076 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.01953 g N = 6.94 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 45.46 % C, 7.87 % H, 6.94 % N.

Invertin Nr. 2a, aus dem Aussenwasser (nach 2 maliger Dialyse).

I. Aschenbestimmung.

2.8698 g trockener Substanz hinterliessen 0.6327 g Asche = 22.04 %.

In 0.4475 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.3104 g	=	69.37 %
SO_3	0.0526 g	=	11.76 %
K_2O	0.0817 g	=	18.27 %
MgO	0.0102 g	=	2.27 %
			101.67

Ausserdem noch etwas Calcium und Spuren Eisen.

II. Elementaranalyse.

1. 0.2362 g trockener Substanz mit 0.0520 g Asche lieferten 0.1412 g H_2O und 0.2908 g CO_2 = 43.56 % C und 8.57 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.2212 g trockener Substanz mit 0,0487 g Asche lieferten 0.1306 g H_2O und 0.2725 g CO_2 = 43.09 % C und 8.47 % H in aschenfreier Substanz.

0.2815 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.0198 g N = 9.02 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 43.32 % C, 8.52 % H, 9.02 % N.

Wie ich die Aschenanalysen ausführte mag folgendes Beispiel zeigen.

2.8698 g Invertin wurden mit 1.1801 g BaO nach *Strecker* [1]) verascht. Die zurückgebliebene baryumcarbonathaltige Asche wog 1.9262 g.

In 1.3628 g dieser Asche wurde die Kohlensäure nach *Kolbe* bestimmt. Die gefundene Menge betrug 0.0803 g oder 0.1134 g CO_2 in 1.9262 g baryumhaltiger Asche.

Die Summe des zugesetzten Baryumoxydes und der entsprechenden Menge CO_2 von der Gesammtasche abgezogen, geben das Gewicht an reiner Asche.

1.9262 — [1.1801 + 0.1134] = 0.6327 g Asche in 2.8698 g Invertin = 22.04 %.

Zur quantitativen Bestimmung einzelner Aschenbestandteile wurde die salzsaure Lösung der Asche, von dem unlöslichen $BaSO_4$ abfiltriert. Das Filter sammt darauf befindlichem Niederschlage wurde mit warmen Wasser gewaschen, im Platintiegel verascht und geglüht; es hinterblieben 0.1535 g $BaSO_4$ = 0.0526 g SO_3. Das salzsaure Filtrat sammt Waschwasser wurde mit Ammoniumcarbonat versetzt, bis eine schwache bleibende Trübung entstand, die man durch einige Tropfen Salzsäure wieder in Lösung bringt. Dann setzte ich tropfenweise Ferrichlorid hinzu, bis die über dem entstehenden, gelblichweissen Niederschlag des Ferriphosphates befindliche Flüssigkeit braun gefärbt erschien, verdünnte auf 300 bis 400 ccm mit heissem Wasser, erhitzte zum Sieden, kochte etwa eine Minute, filtrierte und wusch mit heissem, ammoniumacetathaltigen Wasser gut aus. Der Niederschlag wurde samt Filter in einem Becherglase mit warmer verdünnter Salpetersäure behandelt, wobei der Niederschlag in Lösung ging; aus dieser salpetersauren Lösung wurde die Phosphorsäure in bekannter Weise mit Molyb-

[1]) Liebig's Annalen Bd. 73, S. 366.

dänlösung ausgefällt, der Niederschlag in warmem Ammoniak gelöst, mit Magnesiamixtur wieder gefällt und und nach dem Auswaschen des Niederschlages im Platintiegel geglüht. Es hinterblieben 0.4868 g $Mg_2P_2O_7$ = 0.3104 g P_2O_5. —

In dem Filtrat vom Eisenniederschlag befinden sich nun die alkalischen Erden und Alkalien. Das Baryum wurde, da seine Menge bekannt und weil es nicht zur Asche gehört mit verd. Schwefelsäure ausgefällt und abfiltriert. Das baryumfreie Filtrat wurde in einer Platinschale bis zur Trockene eingedampft, die Ammonsalze verjagt, der zurückgebliebene Rest in wenig Salzsäure gelöst und diese auf genau 100 ccm verdünnt.

50 ccm dieser Lösung wurden zur Bestimmung der Magnesia verwendet. Die Magnesia wurde als Magnesiumammoniumphosphat ausgefällt und nach dem Glühen als Pyrophosphat gewogen; das Resultat wird mit zwei multipliciert. 0.014 g $Mg_2P_2O_7 \times 2 = 0.0102$ g MgO.

Bei einigen Analysen wurde noch eine Trennung mit Ammoniumoxalat vorgenommen, um auch die Menge an Calcium zu erfahren.

Aus den anderen 50 ccm der Lösung wurde die Magnesia durch Barytwasser als Magnesiumhydroxyd abgeschieden und im Filtrat, nach dem Entfernen des Baryums mit Ammoniumcarbonat, sämtliches Alkali als Sulfat bestimmt und auf Kalium umgerechnet; es hinterblieben 0.0756 g $K_2SO_4 \times 2 = 0.0817$ g K_2O.

Dialyse von Rohinvertin ohne Zusatz von Ammoniak.

Um genauere Stickstoffbestimmungen ausführen zu können, dialysierte ich zwei Portionen Rohinvertin, ohne die Invertinlösung vorher mit Ammoniak zu versetzen.

I. 81 g Rohinvertin aus Bierhefe III (I. Auszug) wurden in 350 ccm lauwarmen Wasser gelöst, filtriert und wie die anderen früheren Präparate der Dialyse unterworfen. Die Aussenwässer wurden von 3. Tag an im Vakuum unter 40° eingeengt.

Nachdem die Dialyse am 7. Tag unterbrochen worden, erhielt ich aus der Innenflüssigkeit, nach dem Eindampfen im Vakuum bei ca. 35° auf ein kleineres Volumen und nach dem Ausfällen mit absolut. Alkohol 15.5 g Invertin, welches als Invertin Nr. 3 bezeichnet wurde.

Aus den Aussenwässern erhielt ich nach dem Eindampfen und Ausfällen mit sehr viel absolutem Alkohol auch 15.5 g eines leichtbraunen wirksamen Pulvers, welches ich als Invertin Nr. 3 a bezeichnete.

Trotzdem die Gewichtsmenge dieser zwei Präparate ganz gleich ist, war das Volumen des aus der Innenflüssigkeit gewonnenen Invertins doppelt so gross, als das der Aussenflüssigkeit. Der Unterschied wird wohl in den verschiedenen Aschengehalt zu suchen sein, wie aus den nachstehenden Analysen wahrscheinlich wird.

Invertin Nr. 3, aus der inneren Flüssigkeit.

I. Aschenbestimmung.

4.6138 g trockener Substanz hinterliessen 0.8667 g Asche = 18.78 %.

In 0.7854 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.5711 g	= 72.71 %
SO_3	0.0096 g	= 0.75 %
K_2O	0.0930 g	= 11.84 %
CaO	0.0196 g	= 2.49 %
MgO	0.0868 g	= 11.05 %
		98.84

Eisen Spuren

II. Elementaranalyse.

1. 0.2337 g trockener Substanz mit 0.0438 g Asche lieferten 0.1306 g H_2O und 0.2917 g CO_2 = 42.00 % C und 7.71 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.2101 g trockener Substanz mit 0.0395 g Asche lieferten 0.1183 g H_2O und 0.2594 g CO_2 = 41.47 % C und 7.75 % H in aschenfreier Substanz.

0.3495 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.02264 g N = 7.97 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 41.73 % C, 7.73 % H, 7.97 % N.

Invertin Nr. 3 a, aus dem Aussenwasser.

I. Aschenbestimmung.

6.4953 g trockener Substanz hinterliessen 3.4714 g Asche = 53.44 %.

In 3.0218 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	1.7141 g	=	56.72 %
SO_3	0.1085 g	=	3.59 %
K_2O	1.0142 g	=	33.56 %
CaO	0.0118 g	=	0.39 %
MgO	0.2043 g	=	6.76 %
			101.02

Ausserdem ziemlich viel Eisen.

II. Elementaranalyse.

1. 0.3685 g trockener Substanz mit 0.1964 g Asche lieferten 0.1340 g H_2O und 0.1985 g CO_2 = 31.54 % C und 8.74 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.3650 g trockener Substanz mit 0.1950 g Asche lieferten 0.1383 g H_2O und 0.1933 g CO_2 = 31.01 % C und 9.10 % H in aschenfreier Substanz.

0.5254 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.0238 g N = 9.72 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 31.27 % C, 8.91 % H, 9.72 % N.

II. 160 g eines anderen Rohinvertins wurden in 500 ccm lauwarmen Wasser suspendirt, die Lösung längere Zeit in einem Becherglase stehen gelassen, bis sich das unlösliche am Boden absetzte, und dann filtriert. Das Filtrat wurde sodann 8 Tage lang der Dialyse unterworfen.

Die innere Flüssigkeit wurde im Vakuum unter 40° auf ca. 200 bis 250 ccm eingedampft, filtriert und aus ihr das Invertin wie gewöhnlich mit absol. Alkohol niedergeschlagen. Die Ausbeute des wirksamen lichtbraun gefärbten, als Invertin Nr. 4. bezeichneten Pulvers betrug 22.4 g.

Die vom vierten Tage der Dialyse an gesammelten und eingedampften Aussenwässer, gaben nach der Fällung mit Alkohol 7.5 g eines als Invertin Nr. 4 a bezeichneten, wirksamen lichtbraunen Pulvers.

Die Analysen gaben:

Invertin Nr. 4, aus der inneren Flüssigkeit.

I. Aschenbestimmung.

5.6914 g trockener Substanz hinterliessen 0.9829 g Asche = 17.27 %.

In 0.8171 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.5473 g	=	66.98 %
SO_3	0.0197 g	=	2.41 %
K_2O	0.0422 g	=	5.16 %
CaO	0.0126 g	=	1.54 %
MgO	0.1728 g	=	21.14 %
			97.23 %

Eisen-Spuren.

II. Elementaranalyse.

1. 0.2350 g trockener Substanz mit 0.0406 g Asche lieferten 0.1390 g H_2O und 0.2893 g CO_2 = 40.58 % C und 7.99 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.2538 g trockener Substanz mit 0.0439 g Asche lieferten 0.1459 g H_2O und 0.3141 g CO_2 = 40.80 % C und 7.77 % H in aschenfreier Substanz.

0.3212 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.02124 g N = 7.99 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 40.69 % C, 7.88 % H, 7.99 % N.

Invertin Nr. 4a, aus dem Aussenwasser.

I. Aschenbestimmung.

2.7251 g trockener Substanz hinterliessen 1.1401 g Asche = 41.83 %.

In 0.7644 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.5093 g =	66.62 %
SO_3	0.0026 g =	0.34 %
K_2O	0.1963 g =	25.68 %
CaO	0.0124 g =	1.62 %
MgO	0.0388 g =	4.03 %
		98.29

Spuren von Eisen.

II. Elementaranalyse.

0.3853 g trockener Substanz mit 0.1612 g Asche lieferten 0.2095 g H_2O und 0.3372 g CO_2 = 41.03 % C und 10.45 % H in aschenfreier Substanz.

0.2363 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.02026 g N = 15.08 % N in aschenfreier Substanz.

Behandlung des Rohinvertins und der Bierhefe mit Pankreasferment.

Um zu entscheiden, ob die in meinen Invertinpräparaten enthaltene specifisch wirksame Atomgruppe von eiweissartiger Natur sei, wurden dieselben der Einwirkung eines kräftigen proteolytischen Enzyms unterworfen.

Zu dem dritten und vierten Auszug der Hefe III fügte ich, nachdem beide im Vakuum unter 40° auf 300 ccm eingedampft worden, 20 ccm eines stark wirksamen in Glycerin gelösten Pankreasfermentes hinzu und lies das ganze unter Zusatz von Toluol in einem Kolben bei 25—30° unter häufigem Umschütteln stehen.

Die zurückgebliebene extrahierte Hefe, die ich mit Wasser zu einem Brei anrührte, versetzte ich mit genügender Menge Toluol und behandelte sie mit 50 ccm derselben Pankreaslösung in einer gut verschlossenen Flasche 3 Monate lang bei 25—30°.[1])

Das Invertinextrakt sowie auch die Hefe besassen vor dem Zusatz von Pankreasferment ein starkes Inversionsvermögen; wenn das Invertin ein Proteinstoff wäre, müsste das Invertin bei dieser Behandlung seine Wirksamkeit einbüssen, auch wenn es ein Proteose- oder albumoseartiges Proteinderivat wäre, denn diese werden ja durch längere Einwirkung von Trypsin ebenfalls in kleinere Moleküle zerlegt.

Zuerst habe ich die mit Pankreasferment behandelte Hefe in Arbeit genommen. Ich brachte das ganze auf ein grosses Faltenfilter und erhielt nach noch-

---

[1]) Das verwendete Pankreasferment besass nach einem Vorversuch ein sehr bedeutendes proteolytisches Vermögen; schon 0,5 ccm des Extraktes in 100 ccm Wasser lösten bei 30° in 1/4 Stunde kleine Fibrinflocken vollständig auf.

maligem Filtrieren des Filtrates mit spanischer Erde eine vollkommen klare, dunkelbraun gefärbte, sehr stark invertierende Flüssigkeit. Die Menge des Filtrates, die über 6 Liter betrug, wurde durch Eindampfen im Vakuum auf 600 ccm gebracht, um das Invertin mit Alkohol leichter ausfällen zu können.

Als Probe habe ich zuerst 100 ccm dieser Lösung mit dem fünffachen Volumen absoluten Alkohols versetzt. Es fiel aber nicht wie gewöhnlich ein voluminöser Niederschlag aus, sondern am Boden des Becherglases setzte sich eine ölig-harzige Masse ab, die zwar ein starkes Inversionsvermögen besass, aber auch nach längerer Einwirkung von Alkohol immer noch ihre harzige Beschaffenheit beibehielt.

Nach 24 Stunden goss ich den Alkohol von der schmierigen Masse ab und vermischte den stark braun gefärbten Alkohol mit noch 5 Volumen absoluten Alkohols. Dabei entstand eine milchige Flüssigkeit, aus der sich nach dem Stehen über Nacht ein feiner Niederschlag ausschied, der sich als wirksam erwies. Die Quantität dieses nach dem Waschen mit Alkohol und dem Trocknen über Schwefelsäure, hellbraunen, leichten Pulvers betrug 3.7 g.

Die Analyse ergab Folgendes:

I. Aschenbestimmung.

0.9775 g trockener Substanz hinterliessen 0.0193 g Asche = 1.97 %.

II. Elementaranalyse.

1. 0.3305 g trockener Substanz mit 0.0065 g Asche lieferten 0.2125 g H_2O und 0.4681 g CO_2 = 39.40 % C und 7.33 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.2185 g trockener Substanz mit 0.0042 g Asche lieferten 0.1456 g H_2O und 0.3106 g CO_2 = 39.54 % C und 7.60 % H in aschenfreier Substanz.

0.3109 trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.0336 g N = 11.02 % N in aschenfreier Substanz.

Den harzigen Rest brachte ich mit den übrig gebliebenen 500 ccm des ursprünglichen Extraktes zusammen, worin er sich sehr leicht auflöste. Nachdem diese konzentrierte Invertinlösung mit etwas Wasser verdünnt worden, wurde sie mit Ammoniak im Überschuss versetzt und ihr solange tropfenweise Magnesiamixtur zugefügt, bis sich kein neuer Niederschlag mehr bildete. Nach 12 Stunden habe ich von der phosphorsauren Ammoniakmagnesia abfiltriert und das klare Filtrat der Dialyse unterworfen.

Bei der Fällung der Phosphorsäure durch Magnesia als Ammoniummagnesiumphosphat, wird bekanntlich immer zugleich auch etwas Enzym mit niedergerissen. Der Niederschlag, der in diesem Falle ein Volumen von ungefähr 100 ccm einnahm, wurde deshalb 8 Tage lang im ganzen mit 2 Liter 3 %igen Ammoniaks ausgezogen. Alle diese ammoniakalischen Filtrate wurden gesammelt, im Vakuum eingedampft und auf diese Art das Ammoniak vollständig entfernt. Da sehr wenig Substanz hinterblieb, lohnte es sich nicht, das Enzym, das trotz der langen Einwirkung von Ammoniak wirksam geblieben war, mit Alkohol auszufällen. Die Lösung wurde daher sofort 10 Stunden lang mit 5 %iger Schwefelsäure auf dem Drahtnetze gekocht, um zu erfahren, ob in ihr eine Kohlenhydratgruppe enthalten sei. Dieselbe reduzierte in der Tat am Ende, nach dem Neutralisieren, beim Kochen *Fehling*sche Lösung.

Auch die zu dialysierende Flüssigkeit ist trotz des grossen Überschusses an Ammoniak wirksam geblieben.

Das Aussenwasser wurde wie immer auch diesmal täglich erneuert. Das erste Aussenwasser war braun gefärbt, sehr reich an Salzen, roch sehr stark nach Ammoniak und war unwirksam. Nach dem Eindampfen im Vakuum, nachdem das Ammoniak entfernt war, wirkte die Lösung wieder invertierend. Die nächsten drei Aussenwässer rochen nicht mehr nach Ammoniak, reagierten aber noch stark alkalisch und besassen trotzdem ein starkes Inversionsvermögen. Da die ersten vier Aussenflüssigkeiten sehr reich an Salzen waren, konnte aus ihnen mit Alkohol kein pulverförmiges Präparat abgeschieden werden.

Nach neun Tagen andauernder Dialyse wurde die Innenflüssigkeit im Vakuum unter 40° eingedampft und aus ihr nach dem Filtrieren mit Alkohol 15 g eines lichtbraunen wirksamen Pulvers abgeschieden, welches ich als Invertin Nr. 5 bezeichne.

Die Aussenwässer vom fünften bis neunten Tag waren wirksam, lichtbraun bis gelb gefärbt und reagierten neutral. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurden auch aus diesen durch Alkohol 17.1 g eines wirksamen Pulvers ausgeschieden, das als Invertin Nr. 5 a bezeichnet werden soll.

Die Analysen gaben:

Invertin Nr. 5, aus der inneren Flüssigkeit.

I. Aschenbestimmung.

7.7273 g trockener Substanz hinterliessen 0.2109 Asche = 2.73 %.

In 0.1527 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.0459 g	= 30.06 %
SO_3	0.0129 g	= 8.45 %
K_2O	0.0309 g	= 20.10 %
MgO	0.0545 g	= 35.88 %
		94.49 [1]

Ferner Spuren von Eisen und Calcium.

II. Elementaranalyse:

1. 0.3344 g trockener Substanz mit 0.0093 g Asche lieferten 0.2012 g H_2O und 0.4598 g CO_2 = 38.55 % C und 6.92 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.3046 g trockener Substanz mit 0.0083 g Asche lieferten 0.1822 g H_2O und 0.4323 g CO_2 = 39.78 % C und 6.87 % H in aschenfreier Substanz.

0.5037 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.0121 g N = 4.28 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 39.17 % C, 6.89 % H, 4.28 % N.

Invertin Nr. 5 a, aus dem Aussenwasser.

I. Aschenbestimmung:

4.8271 g trockener Substanz hinterliessen 0.2356 g Asche = 4.88 %.

In 0.1740 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.0049 g	= 2.81 %
SO_3	0.0141 g	= 8.10 %
K_2O	0.0344 g	= 19.77 %

II. Stickstoffbestimmung.

0.4186 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.0371 g N = 9.32 % N in aschenfreier Substanz.

[1]) Der Grund des grossen Minus in dieser und in manchen andern Analysen liegt darin, dass ich in den Aschen die Salzsäure nicht quantitativ bestimmte.

Das mit Pankreasferment behandelte wässerige Rohinvertinextrakt aus dem dritten und vierten Auszug der Hefe III, wurde nach 3 Monaten filtriert und das ganz klare, dunkelbraungefärbte wirksame Filtrat, ohne weiteres, d. h. ohne Zusatz von Ammoniak und Magnesiamixtur der Dialyse unterworfen. Das Aussenwasser wurde auch diesmal täglich erneuert.

Nachdem die Dialyse am 12. Tage unterbrochen war, wurde die innere Flüssigkeit im Vakuum auf 200 ccm eingedampft, filtriert und aus ihr das Invertin mit viel absoluten Alkohol niedergeschlagen. Die Ausbeute des stark wirksamen Pulvers betrug 9.5 g, es sei als Invertin Nr. 6 bezeichnet.

Die Aussenwässer wurden vom dritten Tag an gleichfalls im Vakuum eingeengt und sodann aus dem Extrakt mit Alkohol das Invertin ausgefällt. Die Ausbeute betrug 32 g.

Analyse:

Invertin Nr. 6, aus der inneren Flüssigkeit.

I. Aschenbestimmung:

5.6491 g trockener Substanz hinterliessen 0.3108 g Asche = 5.48 %.

In 0.2662 g Asche sind enthalten:

P_2O_5	0.1612 g	=	60.56 %
SO_3	0.0311 g	=	11.68 %
K_2O	0.0292 g	=	10.97 %
CaO	0.0198 g	=	7.43 %
MgO	0.0158 g	=	5.93 %
			96.57

Ferner Spuren Eisen.

II. Elementaranalyse.

1. 0.2039 g trockener Substanz mit 0.0111 g Asche, lieferten 0.1301 H_2O und 0.2899 g CO_2 = 41.01 % C und 7.54 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.2108 g trockener Substanz mit 0.0115 g Asche, lieferten 0.2967 g CO_2 = 40.72 % C in aschenfreier Subtanz.

0.2635 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.01739 g N = 6.89 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 40.86 % C, 7.54 % H, 6.89 % N.

Übersichtshalber habe ich in der nachstehenden Tabelle die Aschenanalysen von allen aus Bierhefe dargestellten und zwar 1. der durch Dialyse gereinigten, 2. der aus den zugehörigen Aussenwässern gewonnenen Invertinpräparate gleichzeitig zusammengestellt.

Präparat	Asche, Procentgehalt:	In 100 g Asche sind enthalten Gramme:					In 100 g des Präparates sind enthalten Gramme:					Bemerkungen
		P_2O_5	SO_3	K_2O	CaO	MgO	P_2P_5	SO_3	K_2O	CaO	MgO	
Nr. 1	14.86	82.93					12.32					Die Invertinlösung wurde vor der Dialyse mit wenig Ammoniak versetzt.
Nr. 2	7.14	74.74	6.99	15.03		1.65	5.34	0.50	1.07		0.11	Die Lösung wurde vor der Dialyse mit Ammoniak im Überschuss versetzt.
Nr. 3	18.78	72.71	0.75	11.84	2.49	11.05	13.66	0.23	2.22	0.46	2.07	Beide Präparate wurden ohne jeden vorherigen Zusatz v. Ammon. dialysiert.
Nr. 4	17.27	66.98	2.41	5.16	1.54	21.14	11.56	0.41	0.89	0.26	3.65	
Nr. 5	2.73	30.06	8.45	20.10		35.88	0.82	0.23	0.54		0.98	Die Phosphate s. v. d. Dialyse m. Ammon. und Magnesiamixtur ausgef. word.
Nr. 6	5.48	60.56	11.68	10.97	7.43	5.93	3.31	0.64	0.60	0.40	0.32	
Nr. 2 a	22.04	69.37	11.76	18.27		2.27	15.22	2.56	4.03		0.50	
Nr. 3 a	53.44	56.72	3.79	33.56	0.39	6.76	30.31	1.91	17.93	0.20	3.61	
Nr. 4 a	41.83	66.62	0.34	25.68	1.62	4.03	27.87	0.14	10.74	0.67	1.68	
Nr. 5 a	4.88	2.81	8.10	19.77			0.13	0.39	0.96	2.38		

Ferner enthielten alle diese Präparate kleinere oder grössere Spuren von Eisen.

In den Zahlen dieser Tabelle sieht man deutlich den Einfluss der Dialyse auf den Aschengehalt der Präparate, die aus den Innenflüssigkeiten gewonnenen Invertinpräparate sind durchweg aschenärmer, als die aus den zugehörigen Aussenwässern gewonnenen Präparate. Es fällt ferner auf, dass der Aschengehalt bei den Präparaten Nr. 1, Nr. 3 und Nr. 4 trotz ziemlich langer Dialyse, etwas gross geblieben ist.

Es ist eigentümlich, dass die Präparate Nr. 2, aus welchem von der Dialyse ein Teil der Phosphate mit einem grossen Überschuss von Ammoniak ausgefällt wurde und Präparat Nr. 5, welches zwar im Anfang wenig Asche enthielt, weil es aus einer schon viermal extrahierten Hefe herstammt, aber zur Ausfällung der Phosphate mit einem grossen Überschuss von Magnesiamixtur versetzt war und daher sehr reich an Salzen wurde, nach nur 5tägiger bezw. 9tägiger Dialyse viel weniger Asche enthielten, als Präparat Nr. 1, welches mit wenig Ammoniak versetzt 12 Tage und Präparat Nr. 3 und Nr. 4, die ohne Ammoniak 7 resp. 8 Tage der Dialyse unterworfen waren.

Der etwas niedere Aschengehalt des Präparates Nr. 6 rührt auch davon her, dass es aus einer Hefe, die schon zweimal mit Wasser ausgezogen war, hergestellt wurde.

Die grosse Differenz im Aschengehalt der oben erwähnten Präparate lässt sich vielleicht in der Weise erklären, dass man annimmt, dass die Mineralstoffe, wenn sie selber auch nicht die Wirksamkeit des specifischen Enzymes bedingen, trotzdem auf irgend eine Art mit der organischen Substanz verbunden sind und dass dieselben deshalb etwas schwerer durch Dialyse voneinander getrennt werden, weil sie durch die Pergamentmembran fast zur gleichen Zeit hindurchdiffundieren. Für diese

Vermutung spricht auch der Aschengehalt, der aus den Aussenwässern gewonnenen Präparate. Diese sind alle sehr reich an Asche, weil bei der Dialyse die Salze fast zur gleichen Zeit mit der organischen Substanz hindurchdiffundierten. Präparat Nr. 5 a ist viel aschenärmer, weil die zugesetzte Magnesia in den ersten 4 Tagen der Dialyse, durch die Pergamentmembran fast allein ohne viel organische Substanz hindurchdringen konnte.

Der hohe Prozentgehalt an Phosphorsäure in der Asche aller Präparate, ausgenommen Nr. 5 und Nr. 5 a, lässt vermuten, dass ein Teil des Phosphors organisch gebunden ist. Rechnet man die in der Asche bestimmten Basen auf Kalium-, Magnesium- und Calcium-Phosphat um, so sieht man in der Tat, dass die Mengen, in welchen die einzelnen Basen vorhanden sind, zusammen nicht hinreichen, den gesamten Phosphorsäurevorrat zu binden.

An ein paar Beispielen lässt sich dies leicht zeigen.

In 100 g Asche des Präparates Nr. 2 sind 15.03 g K_2O und 1.65 g MgO enthalten, diese brauchen zur Bildung von K_3PO_4 bezw. $MgHPO_4$, 7.54 g P_2O_5 und 2.90 g P_2O_5. Da in der Asche aber 74.74 g P_2O_5 enthalten sind, bleibt noch immer ein Rest von 64.3 g P_2O_5.

100 g Asche des Präparates Nr. 6 mit 60.56 % P_2O_5 enthalten 10.97 g K_2O, 7.43 g CaO und 5.93 g MgO; diese brauchen zur Bildung von K_3PO_4, $Ca_3(PO_4)_2$ und $MgHPO_4$, 5.50 g, 6 26 g und 10.43 g P_2O_5, zusammen 22.19 g P_2O_5; es bleiben also 38.37 g P_2O_5 übrig.

Die Asche des Präparates Nr. 3 a mit 33.56 % K_2O, 0.39 % CaO und 6.76 % MgO enthält 56.72 % P_2O_5. Um aus diesen Basen Phosphate zu erhalten, sind für K_2O 16.84 g, für CaO 0.32 g und für MgO 11.84 g P_2O_5 nötig; es bleibt somit auch hier ein Rest von 27.67 g P_2O_5 übrig.

Wenn man annimmt, dass Kalium in den Präparaten als K_2HPO_4 vorkommt, so bleibt auch in diesem Falle genug P_2O_5 übrig und zwar bei Präparat Nr. 2 60.54 g, bei Nr. 6 35.61 g und bei Nr. 3a 19.25 g.

Der bei den Präparaten Nr. 5 und Nr. 5a angegebene kleine Phosphorsäuregehalt ist auch grösstenteils organisch gebunden, denn die vollständig an anorganische Basen gebundene Phosphorsäure war bereits vor der Dialyse mit Magnesiamixtur entfernt worden.

In der unten angeführten Tabelle sind die Resultate der bereits oben angeführten Elementaranalysen, auf aschenfreie Substanz berechnet, zusammengestellt. Ausser dem Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl* bestimmte ich in einigen Präparaten auch den beim Kochen mit Natronlauge und Magnesiumoxyl als Ammoniak abscheidbaren Stickstoff. Wie ich diese Bestimmungen ausführte, mögen zwei Beispiele zeigen.

I. 0.8505 g Invertin entsprechend 0.8039 g aschenfreier Substanz, wurden in einem Kochkolben mit 300 ccm normal Natronlauge versetzt und eine Stunde destilliert; das Destillat wurde in 40 ccm 1/4 normal Schwefelsäure aufgefangen. Nach Beendigung der Destillation brauchte ich zum Zurücktitrieren 39 ccm 1/4 normal Natronlauge, es wurde also 1 ccm 1/4 normal Schwefelsäure von dem beim Destillieren freigewordenen Ammoniak gebunden, entsprechend 0.0035 g N = 0.43 %.

II. 1.5222 g Invertin entsprechend 1.4388 g aschenfreier Substaaz, wurden in 300 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 5 g frischgebrannter Magnesia 1 1/2 Stunde lang destilliert. Von den als Vorlage dienenden 40 ccm 1/4 normal Schwefelsäure wurden durch Ammoniak 0.85 ccm neutralisiert, entsprechend 0.00297 g N = 0.20 %.

Präparat:	C %	H %	N %	N % nach dem Kochen mit normal Natronlauge	N % nach dem Kochen mit MgO
No. 1	47.69	7.40	7.36		
No. 2	45.46	7.87	6 94	0.85	0.23
No. 3	41.73	7.73	7.97	1.07	0.47
No. 4	40.69	7.88	7.99	0.85	0.57
No 5	39.17	6.89	4.28	0.55	
No. 6	40.86	7.54	6.98	0.43	0.20
No. 2 a	43.32	8.52	9.02		0.64
No. 3 a	31.27	8.91	9.72	2.78	2.21
No. 4 a	41.03	10.45	15.08		
No. 5 a			9.32	0.44	0.34

Alle diese Präparate (No. 1 bis 6) sind wie man sieht, — wohl, da sie nach verschiedenen Methoden gereinigt worden sind —, in ihrer Zusammensetzung wesentlich von einander verschieden und können deshalb auch, trotzdem sie stark wirksam sind, nur als stark fermenthaltige Gemenge gelten. Ein anderes Kriterium für die Reinheit und Einheitlichkeit derartiger Präparate, als die Übereinstimmung der bei ihrer Analyse erhaltenen Daten, ist ja leider noch nicht vorhanden.

Über das Kohlenhydrat der Invertinpräparate.

Nach *Salkowski*[1]) und *Wroblewski*[2]) sollen alle bis jetzt nach verschiedenen Methoden dargestellten Inver-

[1]) Zeit. f. physiol. Chemie 1900 XXXI S. 305.

[2]) Bericht d. deutsch. chem. Gesellsch. 1898 Bd. XXXI S. 1130.

tinpräparate mit einen Kohlenhydrat nur verunreinigt sein. Dass in den Invertinpräparaten ein Kohlenhydrat, — das beim Kochen mit verdünnter Säure einen reducierenden Zucker liefert, den *Kolle*[1]) zuerst als Mannose charakterisierte — vorkommt, ist leicht nachzuweisen, nur ist es meines Erachtens noch nicht gelungen zu beweisen, dass wirklich ein wirksames Invertin existiert, das diese Reaktion nicht gibt.

Wroblewski und *Salkowski* isolierten zwar aus Invertinpräparaten das Kohlenhydrat, welches von *Salkowski* „Hefegummi" genannt wird, nehmen aber ohne jeden weiteren Beweis zu führen einfach an, dass dieses Kohlenhydrat kein Bestandteil des Invertins sei. —

Für diese Annahme spricht nach *Wroblewski* das Verhalten der Invertinlösung zu *Brücke*'schen Reagens, von welchen er angibt, dass sich mit Hülfe desselben das Kohlenhydrat leicht isolieren lässt.

Wie ich mich öfters überzeugen konnte, entsteht in der Invertinlösung mit *Brücke*'schen Reagens, nur dann eine Fällung oder Trübung, wenn das Präparat mit Eiweiss verunreinigt ist. Keines meiner durch Dialyse gereinigten oder mit Pankreasferment behandelten Präparate, auch diejenigen nicht, die ich bei der Dialyse aus dem Aussenwasser gewonnen habe, gaben mit dem erwähnten Reagens irgend eine Fällung oder auch nur Trübung; und doch waren sie sämtlich noch kohlenhydrathaltig.

Invertin ist aber ferner, gerade dem *Brücke*'schen Reagens gegenüber sehr empfindlich. Wird Invertin in Wasser gelöst und mit *Brücke*'schem Reagens versetzt, so wird die Lösung unwirksam. Schon *Kjeldahl*[2]) hat

Journal f. prakt. Chemie 1901 NF. 64 S. 1—70.

[1]) Zeit. f. physiol. Chemie 1900 Bd. XXIX S. 429.

[2]) Zeit. f. das ges. Brauwesen 1881.

nachgewiesen, dass Invertin von Quecksilbersalzen stark geschädigt wird. Schon aus diesem Grunde sollte man das *Brücke*'sche Reagens Invertinlösungen gegenüber nicht anwenden; denn wenn einmal die Enzymlösung durch dieses ihre enzymatische Kraft verloren hat, so haben wir keinen Anhaltspunkt mehr dafür, zu entscheiden ob der durch das Reagens niedergeschlagene, (wenn überhaupt ein Niederschlag entsteht) oder der in der Lösung gebliebene Körper zur Konstitution des Enzyms gehört.

Salkowski führt als Beweis, dass das Kohlenhydrat nicht zum Invertinmolekül gehört, die Tatsache an, dass sich beim Erwärmen einer alkalischen Invertinlösung mit *Fehling*'scher Lösung ein bläulich-weisser Niederschlag der Gummikupferverbindung ausscheidet. Diese Beweisführung ist aber auch nicht stichhaltig; denn das Invertin selbst wird nicht nur durch Säuren, sondern auch durch schwaches Alkali und Erwärmen über 60° unwirksam; es tritt also im Enzymmolekül eine Veränderung ein. Man kann also auch in diesem Falle nicht mit Bestimmtheit sagen, ob das „Gummi" aus einer Mischung oder aus einem einzelnen grösseren Molekül abgespalten wurde.

Zur quantitativen Bestimmung von Hefegummi in Invertinpräparaten beschrieb *Salkowski* ein Verfahren, nach welchem ich, um mich von dessen Brauchbarkeit zu überzeugen, eine Reihe Gummibestimmungen und zwar von jeden einzelnen Präparate mehrere, ausführte.

Ich habe also — genau nach *Salkowski*'s Vorschrift — 0.5—1 g wasserfreies Invertin aus einem Wägegläschen auf etwa 100 ccm destill. Wasser ausgeschüttet, welches sich in einem Becherglase befand, und zwar so, dass das Pulver möglichst auf der Oberfläche des Wassers verteilt war, dann einige Stunden stehen gelassen, hierauf

auf dem Wasserbade erwärmt und die Lösung der Substanz, welche in den meisten Fällen zögernd erfolgt, durch Umrühren mit einem Glasstab befördert, schliesslich einige Tropfen Natronlauge hinzugesetzt.

Die erkaltete Lösung wurde mit 20 ccm *Fehling'* scher Lösung versetzt und wiederum gelind erwärmt. Dabei schied sich ein dicker, bläulich-weisser Niederschlag aus, der sich allmählich zusammenballte. Sobald sich derselbe abgesetzt hatte, wurde er aufs Filter gebracht und mit 50 ccm Wasser abgespült. Die auf dem Filter zurückgebliebene Gummikupferverbindung wurde in einigen Tropfen Salzsäure wieder gelöst und die Lösung auf einmal mit 150 ccm Alkohol absolutus vermischt. Nun entstand zuerst eine milchige Flüssigkeit, aus dieser erfolgte darauf ein weisser Niederschlag, welcher bis zum nächsten Tage unter Alkohol stehen blieb.

Das Gummi wurde auf einem getrockneten, gewogenen Filter gesammelt, sorgfältig mit Alkohol und Aether gewaschen, dann bei 110—115° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

Folgendes sind die Resultate:

Präparat I.

1. Vers.: 0.5161 g Invertin gaben 0.0820 g Gummi = 15.88 %
2. „ 0.3871 „ „ „ 0.0753 „ „ = 19.44 %

Präparat II.

1. Vers.: 0.3839 g Invertin gaben 0.1545 g Gummi = 40.24 %
2. „ 0.5644 „ „ „ 0.1367 „ „ = 24.22 %
3. „ 0.3881 „ „ „ 0.1336 „ „ = 34.42 %

Präparat III.

1. Vers.: 0.8967 g Invertin gaben 0.1107 g Gummi = 12.34 %
2. „ 1.1962 „ „ „ 0.1240 „ „ = 10.36 %
3. „ 0.8711 „ „ „ 0.1008 „ „ = 11.57 %

Präparat IV.

1. Vers.: 0.7769 g Invertin gaben 0.0105 g Gummi = 1.35 %
2. „ 0.6840 g „ „ 0.0087 g „ = 1.27 %
3. „ 0.7670 g „ „ 0.0112 g „ = 1.46 %

Wie man sieht, stimmen diese Zahlen ausser denen im Präparat IV nicht besonders gut untereinander. Der Grund wird wohl darin liegen, dass die ersten drei Präparate ziemlich viel Asche enthielten, und es ist leicht möglich, dass mit dem Kupferniederschlag auch etwas von den Mineralstoffen jedesmal in verschiedenen Mengen mitgerissen wird, die nach dem Auflösen in verdünnter Salzsäure durch Alkoholzusatz wieder ausgefällt werden.

Präparat IV stammt aus dem vierten Auszug einer Hefe. Bemerkenswert ist, dass dieses Präparat, welches nur ca. 4 % Asche enthält, nach einigen Monaten, nachdem es dargestellt war, trotzdem es trocken aufbewahrt wurde, die Wirksamkeit verlor; dasselbe Schwinden der Wirksamkeit beobachtete ich bei allen gummiarmen Präparaten.

Salkowski versuchte aus Hefe durch Extraktion mit Glycerin und alkoholhaltigem Wasser, aus Lösungen von Ferment und Gummi durch Anwendung verschiedener Trennungsmittel wie NaCl, $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, ebenso aus fertigen Präparaten durch fraktionierte Fällung mit Alkohol ein gummifreies Invertin herzustellen, aber immer ohne Erfolg.

Im vorigen Jahre veröffentlichte *K. Ochima*[1]), der bei *Salkowski* arbeitete, eine Abhandlung über das Hefegummi und das Invertin. Unter anderen beschrieb der Verfasser eine Methode, nach der er ein gummi- und

[1]) Zeit. f. physiol. Chemie Bd. XXXVI S. 42.

eiweissfreies, wenn auch schwach wirksames Invertin dargestellt haben will.

Um den Körper, den *Ochima* durch Fällung aus einer neutralen Invertinlösung mit Kupferacetat[1]) dargestellt, aber nur in geringer Menge erhalten hatte, dass er ihn nicht analysieren konnte, näher kennen zu lernen, verarbeitete ich nach seinem Verfahren im Ganzen 80 g Rohinvertin.

Erster Versuch:

40 g Rohinvertin wurden in 800 ccm Wasser gelöst; nach einigen Stunden wurde abfiltriert und zum klaren Filtrat Natriumcarbonat bis zur neutralen Reaktion zugesetzt.

Als Indikator habe ich Phenolphtalein angewendet, weil die Rohinvertinlösungen wegen der vorhandenen Phosphorsalze mit Lakmus meistens amphoter reagieren. Als ich diese Lösung nach der Neutralisation mit 15 g Kupferacetat in 400 ccm Wasser versetzte, bildete sich sogleich eine starke Trübung und nach einiger Zeit ein graublauer, voluminöser Niederschlag, der zuerst im Becherglase durch Dekantieren, zuletzt auf dem Filter gut mit Wasser gewaschen wurde. Dieser Niederschlag wurde hierauf in einer Reibschale mit etwas Wasser zu einem gleichmässigen dünnen Brei verrieben und dann in einem Becherglase durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Sobald sich das Kupfersulfid nach einigem Stehen bei 35—40° abgesetzt hatte, wurde durch ein grosses Faltenfilter filtriert, der Schwefelwasserstoff aus dem Filtrate rasch im Vakuum entfernt, die Flüssigkeit selber bei ca. 35° bis auf 50 ccm eingeengt und dann mit soviel

[1]) Nach Salkowski bewirkt Kupfersulfat und -acetat keine Fällung oder Trübung in Invertinlösungen. Zeit. f. physiol. Chem. Bd. XXXI. 1900. Seite 316.

absolutem Alkohol versetzt, bis sie milchig wurde. Aus dieser schied sich beim Stehen über Nacht ein gelblich weisses Pulver aus.

Die Wirksamkeit dieses Niederschlages, dessen Menge nach dem Filtrieren, Waschen mit Alkohol und Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure 0.95 g betrug, war sehr minimal. Es waren verhältnismässig grössere Mengen der Substanz nötig, um eine Rohrzuckerlösung kaum sichtbar zu invertieren. 20 ccm einer 1%igen Rohrzuckerlösung, die mit 0.05 g des Pulvers versetzt worden waren, reducierten *Fehling*'sche Lösung erst, nachdem das Enzym 5 Stunden lang bei 35° mit dem Zucker in Berührung gewesen war. Das Pulver selbst war in Wasser leicht löslich und gab allerdings weder die Gummireaktion mit *Fehling*'scher Lösung noch die Biuret-Reaktion.

Die Analyse dieses Präparates gab folgende Werte:

I. Aschenbestimmung.

0.1734 g trockener Substanz hinterliessen 0.0920 g Asche = 53.06%. Die Asche enthielt eine reichliche Menge Phosphorsäure.

II. Elementaranalyse:

1. 0.2161 g trockener Substanz mit 0.1164 g Asche lieferten 0.0812 g H_2O und 0.1234 g CO_2 = 33.15% C und 8.95% H in aschenfreier Substanz.

2. 0.2028 g trockener Substanz mit 0.1078 g Asche lieferten 0.0785 g H_2O und 0.1149 g CO_2 = 32.93% C 9 32% H in aschenfreier Substanz.

0.1300 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.00808 g N = 13.23% N in aschenfreier Substanz.

Die Zusammensetzung der aschenfreien Substanz wäre somit: 33.04% C, 9.13% H, 13.23% N.

Das vom Kupferniederschlage getrennte kupferhaltige Filtrat, aus dem das Invertin oder wenigstens der grösste Teil desselben schon ausgeschieden ist und in dem das Hefegummi enthalten sein soll, habe ich mit den Waschwässern vereinigt und aus dem Ganzen das Kupfer mit Schwefelwasserstoff gefällt. Nachdem sich das Kupfersulfid bei 35° abgesetzt, wurde schnell durch ein grosses Faltenfilter filtriert und das Filtrat im Vakuum zugleich von Schwefelwasserstoff befreit und auf ein kleines Volumen gebracht. Dieses braune Extrakt wurde noch ein zweites Mal filtriert und dann mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols vermischt. Dabei fiel ein schwach gelb gefärbter leichter Niederschlag aus, der das Aussehen des Rohinvertins besass und auch die *Salkowski*sche Gummireaktion gab.

Die Ausbeute an diesem, nach dem Waschen mit Alkohol und Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure schwach gelben Pulver, welches trotz der Behandlung mit Schwefelwasserstoff noch deutlich wirksam war, betrug 17.0 g. 0.8030 g dieses Präparates hinterliessen 0.3389 g Asche = 41.60 %; 0.2189 g Substanz gaben 0.00945 g N = 7.41 % in aschenfreier Substanz.

Der Aschengehalt des Ausgangsmateriales hatte nur 32.42 % und der Stickstoffgehalt deselben, bezogen auf aschenfreie Substanz, 10.79 % betragen.

Das Steigen des Aschengehaltes ist leicht zu erklären. Beim Auflösen des Rohinvertins geht nicht alle organische Substanz in Lösung, dagegen aber die mineralischen Bestandteile. Fällt man nun aus einer solchen wässerigen Lösung das Invertin mit Alkohol, so bleibt, wie sich aus der Farbe des Gemisches ergiebt, sehr viel organische Substanz in Lösung, während die anorganischen Salze aus dem hochprozentigen Alkohol

von 95 % sehr reichlich wieder ausfallen. Was den Stickstoffgehalt anlangt, so scheint es, dass gerade etwas stickstoffhaltige Substanz in diesem alkoholischen Gemisch gelöst zurückbleibt, während ein anderer Teil derselben von dem Kupferniederschlag mit niedergerissen wurde, denn der N-gehalt des Ausgangsmaterials war um 3.38 % höher gewesen.

Zweiter Versuch:

Abermals 40 g Rohinvertin wurden in Wasser gelöst, die Lösung filtriert, der Filterrückstand mit etwas Wasser nachgewaschen, das Waschwasser mit dem Filtrat vereinigt und dann auf ein Liter verdünnt. Da *Ochima* in seiner Arbeit keine genaue Auskunft gibt über die Menge des Kupferacetates, mit der er das Enzym aus der Rohinvertinlösung als Kupferverbindung ausgeschieden hat, sondern zu der 1 %igen Invertinlösung (wieviel von der Lösung?) 20 ccm 5 %iger Kupferacetatlösung zusetzt, so habe ich zu der mit Natriumcarbonat neutralisierten Lösung solange 5 %ige Kupferacetatlösung zugefügt, bis sich kein neuer Niederschlag mehr bildete. Im ganzen brauchte ich dazu 1500 ccm. Der Niederschlag wurde wieder zuerst durch Dekantieren, dann auf dem Filter, bis das Waschwasser ganz farblos ablief, ausgewaschen. Dazu waren im Ganzen über 2 l Wasser nötig.

Der Kupferniederschlag wurde in einer Reibschale mit Wasser gut verrieben, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, dann nach dem Absitzen bei 35—40° das Kupfersulfid sofort abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Das immer noch dünnflüssige Extrakt wurde mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols vermischt und so zunächst eine milchige Flüssigkeit erzeugt, aus der sich bald ein voluminöser Niederschlag ausschied. Dieser Niederschlag, der auf dem Filter auch noch nach dem Waschen mit absolutem Alkohol durch sein grosses

Volumen eine Masse von mindestens 15 g Gewicht vortäuschte, schrumpfte nach dem Trocknen im Vakuum zu einem Häuflein von nur 1.4 g trockener Substanz zusammen.

Analyse:

I. Aschenbestimmung.

0.4431 g trockener Substanz hinterliessen 0.225 g Asche = 50.77 % . In der Asche sind 75.40 % P_2O_5 enthalten.

II. Elementaranalyse.

1. 0.4112 g trockener Substanz mit 0.2085 g Asche lieferten 0.195 g CO_2 und 0.1334 g H_2O = 26.32 % C und 7.36 % H in aschenfreier Substanz.

2. 0.2210 g trockener Substanz mit 0.1122 g Asche lieferten 0.0698 g H_2O und 0.1012 g CO_2 = 25.98 % C und 7.17 % H in aschenfreier Substanz.

0.2942 g trockener Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.01307 g N = 9.02 % N in aschenfreier Substanz.

Im Mittel: 26.04 % C, 7.26 % H, 9.02 % N.

Auch dieses Präparat war frei von Kohlenhydrat und Eiweiss, aber ganz unwirksam.

Das vom Niederschlag getrennte kupferhaltige Filtrat wurde wie beim ersten Versuch mit Schwefelwasserstoff zersetzt, dann vom Kupfersulfid abfiltriert, im Vakuum bis zur Sirupdicke eingedampft und mit viel absoluten Alkohol versetzt. Abermals bildete sich eine milchige Flüssigkeit, die sich über die Nacht klärte und am Boden des Becherglases eine ölige Masse absitzen liess, die noch gut invertierend wirkte. Ich versuchte durch wiederholtes Auflösen des Niederschlages mit Wasser und nachheriges Fällen mit absolutem Alkohol ein pulveriges Präparat zu gewinnen, aber vergebens; der Niederschlag

blieb stets von harziger, fast öliger Beschaffenheit. Zum Schluss wurde die Masse im Vakuum-Exsiccator zum Trocknen über Schwefelsäure gestellt, aber nach 4 Tagen, noch bevor es ganz trocken und fest geworden, hatte es seine Wirksamkeit völlig verloren.

Die Behandlung des Kupferniederschlages mit Schwefelwasserstoff ist sicher nicht der Grund, warum die nach dem Verfahren von *Ochima* hergestellten Präparate sehr wenig wirksam oder sogar ganz unwirksam gewesen sind, denn die kupferhaltigen Filtrate, die ja ebenfalls mit Schwefelwasserstoff versetzt und nach dem Entkupfern eingedampft worden waren, waren trotz dieser Behandlung wirksam geblieben.

Ich glaube vielmehr, dass durch Kupferacetat überhaupt gar kein Invertin ausgefällt wird und dass der dadurch erzeugte Niederschlag andere Stoffe enthält, die dem wirksamen Enzym nur beigemengt waren.

Das Präparat von *Ochima*, ebenso wie mein erstes, in gleicher Weise dargestelltes war etwas wirksam. Vermutlich war diese Wirksamksit nur durch etwas mitgerissenes Invertin bedingt, das beim darauffolgenden Auswaschen mit Wasser nicht vollständig entfernt worden war. Diese Vermutung liegt um so näher, als das Invertin ein sehr wirksames Enzym ist und schon die geringsten Spuren von ihm Rohrzucker zu invertieren vermögen. Daher war denn auch mein zweites Präparat, bei dessen Darstellung ich den Kupferniederschlag vor der Behandlung mit Schwefelwasserstoff sorgfältig ausgewaschen habe, völlig unwirksam.

Da sich somit die Frage, ob das „Hefegummi“ zur Konstitation des Invertins gehört, oder nicht, nach *Ochimas* Verfahren nicht entscheiden lässt; da man ferner, wie

schon *Salkowski* zeigte, auch durch Fällung mit Neutralsalzen oder durch fraktionierte Fällung mit Alkohol nicht zum Ziele gelangt und da endlich Hilfsmittel, die einen sauren oder Basischen Charakter besitzen, sowie eine Temperatur über 60°, wegen der ausserordentlichen Empfindlichkeit des Enzymes selbstverständlich ausgeschlossen sind — denn wenn einmal die Wirksamkeit durch diese verloren gegangen ist, so hat man ja kein Kriterium mehr, ob der isolierte Körper tatsächlich das gesuchte Enzym gewesen, oder nicht, — so versuchte ich nunmehr das Kohlenhydrat in eine alkohollösliche Form überzuführen, um es beim Fällen mit Alkohol in Lösung zu behalten, und glaubte das am leichtesten durch Verzuckerung erzielen zu können. —

α Behandlung des Rohinvertins mit Diastase.

Zu diesem Zweck habe ich 5 g Rohinvertin in 200 ccm Wasser gelöst, die Lösung bei 40° 6 Stunden lang der Wirkung einer kräftigen aus Grünmalz frischbereiteter Diastase ausgesetzt, dann, nachdem die Lösung im Vakuum eingedampft worden, das Invertin mit absolutem Alkohol niedergeschlagen und den Niederschlag längere Zeit mit absolutem Alkohol ausgewaschen. Hierauf wurde das gelbliche Pulver nach dem Trocknen im Vakuum mit 5%iger Schwefelsäure gekocht, die Lösung neutralisiert und mit *Fehling*'scher Lösung geprüft. Sie reducierte dieselbe auch immer.

Denselben Versuch wiederholte ich noch mehrmals in verschiedenen Modifikationen; so habe ich zur Invertinlösung grössere Mengen Diastase zugesetzt und die Einwirkungsdauer derselben bis auf 48 Stunden verlängert, der Erfolg war aber immer negativ, denn das Invertinpräparat blieb Kohlenhydrathaltig.

β Behandlung von Rohinvertin mit Hefe.

In der Meinung, dass die Hefe, in der ja das Kohlenhydrat enthalten und aus der es nach *Salkowski*[1]) durch Kochen mit 3 %iger Kalilauge und Fällen als Kupferverbindung leicht darzustellen ist, vielleicht auch ein Enzym ausscheiden werde welches das Kohlenhydrat in kleinere Moleküle zerlegt die darauf vergoren werden, habe ich versucht, eine Invertinlösung durch Hefe vergären zu lassen.

Erster Versuch:

10 g Rohinvertin wurden in 150 ccm lauwarmen Wassers gelöst und ohne dass man zuvor filtrierte mit etwas Hefe versetzt; hierauf das Ganze in einem Kolben der mit einem Wattepfropf verschlossen war fünf Tage hindurch einer Temperatur von 30^0—35^0 ausgesetzt. Sodann wurde von der Hefe abfiltriert und das Filtrat solange mit spanischer Erde filtriert, bis die Lösung ganz klar und frei von Hefezellen war. Um zu prüfen, ob in dem wirksam gebliebenen Filtrate noch Kohlenhydrat enthalten sei, oder ob es von der Hefe in Ermangelung anderer Kohlenhydrate angegriffen, gespalten und vergoren worden, habe ich dasselbe zuerst mit etwas Natronlauge alkalisch gemacht und dann mit etwas *Fehling*'scher Lösung versetzt. Als nun das Ganze auf dem Wasserbade schwach erwärmt wurde, entstand ein grau-blauer Niederschlag von voluminöser Beschaffenheit, der sich nicht zusammenballte, nicht das Aussehen der der Gummikupferverbindung hatte, sich viel schwerer in Salzsäure löste und allem Ausscheine nach zum grössten Teil aus Eiweissstoffen bestand. Ein kleiner Teil dieses Niederschlages wurde längere Zeit mit verdünnter Salz-

[1]) Berichte d. deutsch. Chem. Gesell. Bd. XXVII. S. 497.

säure gekocht, dann neutralisiert und mit *Fehling*'scher Lösung auf Zucker geprüft. In der Tat trat nach kurzer Zeit Reduktion ein.

Zweiter Versuch:

10 g Rohinvertin wurden in 150 ccm lauwarmen Wassers gelöst und wie oben beschrieben mit etwas Hefe einer Temperatur von $25-30^0$ ausgesetzt. Nach 8 Tagen wurden aus dem ganz klaren von Hefezellen befreiten Filtrat mit Alkohol 3 g wirksamen Invertins ausgefällt, welches die *Salkowski*'sche „Gummireaktion" gab und nach der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure die *Fehling*'sche Lösung reducierte.

Da man nach allen diesen Versuchen aus Rohinvertin kein gummifreies Enzym darstellen kann, versuchte ich es direkt aus Hefe zu gewinnen.

Am zweckmässigsten schien es mir zu diesem Zweck von der Selbstgärung der Hefe Gebrauch zu machen. Es ist eine altbekannte Tatsache, dass dickflüssige Hefe bei einer günstigen Temperatur (20^0-25^0), obwohl keine Zuckerlösung zugegen ist, aus ihrer eigenen Substanz Alkohol und Kohlensäure bildet. Bei der Selbstgärung muss also der Alkohol auf Kosten von schon in den Mutterzellen vorhandenen Substanzen gebildet werden.

Wie die oben beschriebenen Versuche zeigten wird Hefegummi von der Hefe nicht angegriffen. *Alfred Koch* und *Hosäus*[1]) zeigten dasselbe auch für das Glykogen. Sie fanden nämlich, dass Hefe der Nährlösung zugesetztes Glykogen weder assimilieren noch vergären kann und erklären das dadurch, dass einerseits das Glykogen nicht durch die Zellmembran zu diffundieren

[1]) Centralblatt f. Bact. 1894 XVI. S. 145.

vermag und anderseits, dass die Hefe kein Enzym ausscheidet welches das Glykogen in einen diffundierenden Zucker umzuwandeln vermag. Wenn nun auch von aussen zugefügtes Glykogen von der Hefe nicht vergoren wird, so ist es nach *Lintner*[1]) doch unzweifelhaft in erster Linie an der Selbstgärung beteiligt; denn es zeigt sich regelmässig, dass Hefen die eine starke Glykogenreaktion geben, auch einer intensiven Selbstgärung fähig sind und dass Hefe welche die Selbstgärung durchgemacht hat keine Glykogen-Reaktion mehr gibt, also auch kein Glykogen mehr enthält; es ist aber doch möglich dass auch noch andere Kohlenhydrate bei diesem Vorgang mitwirken. *Lintner* machte auch die Beobachtung, dass manche Salze die Selbstgärung besonders beschleunigen. *Salkowski* ist der Meinung, dass in der Hefe durch die in derselben enthaltenen Enzyme von den Kohlenhydraten nur das Hefeglykogen, möglicherweise auch die Cellulose in Zucker umgewandelt, also auch vergoren wird, nicht aber das Hefegummi.

Um die Selbstgärung der Hefe zu beschleunigen und energischer zu gestalten, vermischte ich sie mit verschiedenen Mengen Natriumsulfats und stellte sodann, aus solcher Hefe, die die Selbstgärung durchgemacht, Invertin dar. Alle derartige Präparate aber erwiesen sich als Kohlenhydrathaltig.

Zuletzt setzte ich in einen Kolben der mit einem Wattepfropf verschlossen blieb, 2500 g Hefe mit 2000 ccm Wasser an und lies das Ganze 15 Tage bei 25^0—35^0 stehen um durch die lange Einwirkungsdauer eine vollständige Zersetzung zu erzielen. Nachdem ich die über der Hefe stehende gelbe Flüssigkeit, die frei von Bak-

[1]) Centralbl. f. Bact. 1899. 2. Ab. Bd. V, Nr. 23.

terien und reich an Eiweisszersetzungsprodukten war, abgegossen, behandelte ich die zurückgebliebene Hefe zuerst mit Alkohol und extrahierte sie dann nach dem Abfiltrieren des letzteren, mit Wasser. Aus der wässerigen Lösung wurde in bekannter Weise nach dem Eindampfen im Vakuum mit absolutem Alkohol das Invertin niedergeschlagen. Auf diese Weise erhielt ich 15.5 g eines weissen voluminösen Kohlenhydrat enthaltenden Pulvers welches ein grosses Inversionsvermögen besas und 34.81 % Asche enthielt.

Hydrolytische Spaltung des Invertins.

Im Folgenden möchte ich noch einige Beobachtungen über die Spaltung der Invertinpräparate beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure mitteilen.

Da ich wegen Mangels an Material viel zu kleine Ausbeuten an einzelnen Spaltungsprodukten erhalten habe um diese reinigen und zuversichtlich analysieren zu können, sind diese Versuche nur als orientierende Vorversuche anzusehen. Ich will sie auch nur deshalb hier anführen, weil sie vielleicht Fingerzeige für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiete bieten können. Wenn auch die verwendeten Invertinpräparate in der Mehrfach beschriebenen Weise gereinigt waren, kann es mir natürlich nicht in den Sinn kommen, zu behaupten, dass es bereits reine und einheitliche Substanzen gewesen seien, so ware es auch verfrüht, aus den gefundenen Spaltungsprodukten auf die wirkliche Zusammensetzung des Enzymes zu schliessen; aber wohl vermögen die letzteren bereits darüber Aufschluss zu geben, was alles das wirksame Enzym nicht sein kann. —

Spaltung des durch Dialyse gereinigten Invertins mit 2.5 %iger Schwefelsäure.

Erster Versuch:

10 g Invertin wurden in 400 ccm warmer Schwefelsäure von 2.5 % gelöst, filtriert, in einem Literkolben auf dem Drahtnetze erhitzt und ¾ Stunden lang im Sieden erhalten. Die saure Lösung, die beim Kochen, besonders aber im Anfang stark schäumte, wurde nach dem Abkühlen mit Wasser auf 600 ccm verdünnt und durch Zusatz von Schwefelsäure der Säuregehalt der ganzen Flüssigkeit auf 5 % gebracht. Dann fügte ich dieser sauren Lösung solange eine stark concentrierte Lösung von Phosphorwolframsäure in 5 %iger Schwefelsäure hinzu, als sich noch ein Niederschlag bildete.

Nach dem Absitzen wurde abfiltrirt und der Niederschlag zuerst durch Dekantieren, dann an einer Nutsche gut mit 5 %iger Schwefelsäure, in der etwas Phosphorwolframsäure gelöst war, ausgewaschen. —

I. Phosphorwolframsäureniederschlag.

Den Niederschlag habe ich in einer Reibschale mit warmen Wasser zu einem gleichmässigen Brei angerieben in einem geräumigen Becherglase auf dem Wasserbade mit einer concentrierten wässerigen, noch warmen Lösung von Baryumhydroxyd behandelt und noch solange neue Baryumlösung zugegossen, bis die Flüssigkeit nicht mehr sauer, sondern alkalisch reagierte. Dann liess ich das Ganze auf dem Wasserbade absitzen, filtrierte vom überschüssigen Baryumwolframat und Baryumsulfat ab und wusch den Niederschlag mit heissem Wasser gut aus.

Aus dem hellgelb gefärbten Filtrat, das einen leimartigen Geruch hatte, wurde der grösste Teil des über-

schüssigen Baryumhydrates mit verdünnter Schwefelsäure und der Rest des Baryums mit Kohlensäure entfernt.

Die jetzt von Phosphorwolframsäure und Baryum vollständig befreite Flüssigkeit habe ich im Vakuum bis auf 100 ccm eingedampft, nochmals filtrirt, dann mit einigen ccm einer 10% igen ammoniakalischen Silberlösung versetzt. Es entstand sofort eine Trübung, aus der sich bald ein brauner flockiger voluminöser Niederschlag absetzte. Nach einigen Stunden wurde abfiltriert und der Niederschlag zuerst mit ammoniakalischem Wasser, dann gut mit Alkohol und Äther gewaschen. Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, stellte der sehr zusammengeschrumpfte stickstoffhaltige Filterrückstand eine dunkelbraune amorphe Masse dar, dessen Ausbeute 0.1907 g betrug.

Wegen der geringen Menge konnte keine vollständige Analyse, sondern nur eine C und H Bestimmung ausgeführt werden.

0.1907 g trockener Substanz gaben 0.0412 g H_2O, 0.1217 g CO_2 und hinterliessen 0.0992 g Ag, entsprechend

C 17.40% H 2.41% Ag 52.02%.

Wenn wir annehmen dürften, dass die analysierte Substanz ein einheitlicher Körper gewesen und dass das Silbersalz nur ein Atom Ag enthalten habe, so berechnete sich das Mol. Gew. aus dem gefundenen Silber auf 207.5 und die Formel wäre somit AgC_3H_5NxOy.

Die Atomgewichte von Ag, C_3, und H_5 geben die Summe 149, es bleibt somit ein Minus von 58.5, welches vielleicht durch einen Sauerstoff und Stickstoffgehalt zu decken ist; man könnte diese Deckung annähernd durch die Annahme erreichen, dass noch drei Atome Stickstoff und ein Atom Sauerstoff im Moleküle vorhanden waren; denn deren Atomgewichte $(3 \times 14 + 16)$ würden zu-

sammen genau 58 ausmachen. Wenn die Kombination richtig wäre, so würde die Formel der fraglichen Substanz $AgC_3H_5N_3O$, ihr Mol. Gew. also 207 sein. —

Zu dem vom Silberniederschlage abfiltrierten Ammoniakalischen Filtrate wurde langsam bis zur schwach sauren Reaktion verdünnte Salpetersäure zugefügt. Jetzt entstand von Neuem eine Trübung und aus ihr setzte sich eine sehr geringe Menge, nur 0·03 g eines Silber- und Stickstoffhaltigen Körpers ab, der abermals eine bräunliche Farbe besass.

2. Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Die von den Phosphorwolframsäureniederschlag abfiltrierte, noch freie Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure enthaltende Flüssigkeit, wurde in der Wärme mit einer concentr. warmen Baryumhydroxydlösung im Überschuss versetzt. Nach dem Absitzen auf dem Wasserbade wurde vom Baryumsulfat und Baryumwolframat abfiltriert, aus dem Filtrat das überschüssige Baryum mit Kohlendioxyd als Baryumcarbonat abgeschieden, nach einiger Zeit filtriert, der Filterrückstand mit heissem Wasser gut ausgewaschen, das Filtrat mit dem Waschwasser bis auf 150 ccm eingedampft und nochmals filtriert.

Die gelbe Flüssigkeit reagierte neutral und reducierte, trotzdem sie ausser einigen stickstoffhaltigen Spaltungsprodukten noch das Kohlenhydrat des Präparats enthalten musste, die *Fehling*'sche Lösung erst nach längerem Kochen und nur sehr schwach. Das $^3/_4$ Stunden andauernde Kochen mit $2\,^1/_2\,\%$iger Schwefelsäure genügte also nicht, um das vorhandene Kohlenhydrat in reducierenden Zucker zu verwandeln; es wurde nur ein sehr

kleiner Teil des ersteren von der Säure angegriffen und hydrolysiert. Darum säuerte ich die eingedampfte Lösung noch einmal mit soviel Schwefelsäure an, dass der Gehalt an dieser 5 % betrug und kochte dann das Ganze in einem mit Rückflussrohr versehenen Rundkolben noch 5 Stunden über dem Drahtnetze. Nach dem Kochen verdünnte ich mit Wasser und digerierte auf dem Wasserbade mit frisch gefälltem kohlensauren Baryum solange, bis die Flüssigkeit neutral reagierte. Alsdann filtrierte ich vom Baryumsulfat und vom Überschuss des Baryumkarbonats ab, zog den Filterrückstand einige Male mit warmen Wasser aus und dampfte das Filtrat samt Waschwasser im Vakuum auf ein kleines Volumen ein.

Dieses eingedampfte Extrakt, welches die *Fehling*'sche Lösung stark reducierte, wurde in einem Becherglase mit dem 10 bis 12 fachen Volumen 96 %igem Alkohol übergossen, wobei sich eine braune flockige Masse abschied. Nachdem das Ganze über die Nacht ruhig gestanden, wurde abfiltriert und zuerst der beim Eingiessen von Alkohol entstandene Niederschlag (a), dann das alkoholische Filtrat (b) weiter verarbeitet.

a) Um den Niederschlag, der Baryum enthielt, zu reinigen, wurde derselbe in Wasser gelöst und mit einer verdünnten Schwefelsäure einige Zeit gekocht. Auf diese Weise konnte das Baryum ganz entfernt werden. Nachdem ich vom Baryumsulfat abfiltriert, wollte ich die organische Substanz wieder mit Alkohol ausfällen, was mir aber nicht gelang, da der baryumfreie Körper in Alkohol bei Gegenwart von Schwefelsäure löslich war. Ich digerierte daher das Ganze auf dem Wasserbade wieder mit frisch gefälltem Baryumcarbonat, um die freie Schwefelsäure zu binden und wieder das Baryumsalz herzustellen. Aus dem Filtrate vom gebildeten Baryum-

sulfat und vom überschüssigen Baryumcarbonat konnte in der Tat die organische Baryumverbindung mit Alkohol nach Zusatz von wenig Kochsalz wieder gefällt werden. Die Ausbeute an dem stickstoffhaltigen, hellbraun gefärbten amorphen Pulver betrug 0.4095 g.

Nur um auch hier wieder wenigstens eine ungefähre Vorstellung von der Zusammensetzung dieses Pulvers zu erhalten, führte ich von ihm eine Analyse aus:

0.1796 g der Substanz in einem Platintiegel mit wenig conc. Schwefelsäure übergossen, hinterliessen nach dem Abrauchen der Säure 0.0993 g $BaSO_4$ = 32.54 % Ba

0.1220 g Substanz lieferten 0.0479 g H_2O und 0.1079 g CO_2 = 24.12 % C und 4.37 % H

0.1074 g Substanz gaben bei + 13° und 748 mm Bar. 4.0 ccm Stickstoff = 4.33 % N.

b) Das braune von der Baryumverbindung abfiltrierte alkoholische Filtrat welches die *Fehling*'sche Lösung reducierte, dampfte ich im Vakuum bis auf ca. 100 ccm ein und versetzte es dann mit einer Lösung von 5 g p. Bromphenylhydrazin und 5 g essigsauren Natrium in 100 ccm Wasser, dem etwas Essigsäure zugesetzt war. Da sich bis zum nächsten Tage kein Hydrazon abgeschieden hatte, dampfte ich die Lösung auf dem Wasserbade etwas ein und erhielt nun nach einiger Zeit das Osazon der Mannose.

Zweiter Versuch:

30 g Invertin wurden in 400 ccm 2.5 %iger Schwefelsäure gelöst, eine Stunde gekocht und nach dem Abkühlen, wie oben beschrieben, mit Phosphorwolframsäure ein Teil der Zersetzungsprodukte ausgefällt.

1. Phosphorwolframsäureniederschlag.

Auch dieser Niederschlag wurde auf dem Wasserbade mit Baryumhydroxydlösung zersetzt, dann filtriert und aus dem Filtrate das überschüssige Baryum mit Kohlensäure ausgefällt. In dem auf 100 ccm eingedampften baryumfreien Filtrate wurde nach Zusatz von Ammoniak und ammoniakalischer Silberlösung ein brauner, sehr voluminöser Niederschlag erzeugt, der sich nach einigen Stunden am Boden des Becherglases vollkommen absetzte. Es wurde filtriert, der Niederschlag auf dem Filter mit ammoniakalischen Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet; die Ausbeute betrug nur 0.3519 g.

0.1707 g trockener Substanz gaben 0.0339 g H_2O, 0.1167 g CO_2 und hinterliessen 0.0965 g Ag, entsprechend

C 18.64 %, H 2.22 %, Ag 56.66 %.

0.1812 g Substanz gaben bei + 13° und 748 mm Bar. 23 ccm Stickstoff = 14.75 % N.

Angenommen dass der Körper rein wäre, so lässt sich aus den bei der Analyse gefundenen Zahlen die Formel $AgC_3H_4N_2O$ = Mol. Gew. 192, zusammenstellen.

Das aus den gefundenen Silber berechnete Mol. Gew. wäre 190.9.

Aus dem silberhaltigen ammoniakalischen Filtrat konnte nach dem Übersäuern mit Salpetersäure in sehr kleiner Menge ein brauner stickstoffhaltiger Niederschlag abgeschieden werden.

2. Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Das Schwefel- und Phosphorwolframsäure enthaltende Filtrat wurde in der Wärme im Überschuss mit einer Baryumhydroxydlösung versetzt und aus dem Filtrat das

überschüssige Baryumhydroxyd mit Kohlensäure entfernt. Nachdem vom ausgeschiedenen Baryumcarbonat abfiltriert und der Niederschlag ausgewaschen worden war dampfte ich das Ganze bis auf ca. 150 ccm ein. Die neutrale etwas braun gefärbte Flüssigkeit säuerte ich mit Schwefelsäure bis auf 5 % wieder an und kochte dann das Ganze, um das Kohlenhydrat des Invertins vollständig zu hydrolysieren, in einem mit Rückflussrohr versehenen Kolben 6 Stunden. Nach dem Kochen stumpfte ich die Säure mit Baryumcarbonat ab und dampfte die neutrale Lösung nach dem Filtrieren, im Vakuum bis auf 50 ccm ein.

Als ich dieses Extrakt, welches die *Fehling*'sche Lösung alsbald reducierte, mit der 12 fachen Menge 96 %igem Alkohol übergoss, schied sich eine braune halbflüssige Masse ab, die nach dem Stehen über Nacht unter Alkohol fest und pulverisierbar wurde. Der Niederschlag (a) wurde durch Filtration von der alkoholischen Lösung (b) getrennt und weiter verarbeitet.

a) Als ich den Niederschlag (ca. 3 g) in einigen ccm Wasser löste und zur weiteren Reinigung wieder mit Alkohol ausfällte, bemerkte ich, dass von der organischen Substanz etwas in Lösung ging, während der mit Baryum verbundene Teil unlöslich blieb. Ich verdampfte in einem Uhrglas einige Tropfen von dieser alkoholischen Lösung und fand, dass sich auf dem Glase ein weisser Beschlag festsetzte der unter dem Mikroskope betrachtet, aus lauter kleinen Krystallblättern bestand. Ich kochte deshalb den Niederschlag mit immer neuen Mengen Alkohol von 95 % aus, solange sich überhaupt noch etwas löste, dampfte die alkoholischen gelben Filtrate zusammen auf dem Wasserbade ein, extrahierte den Rest wieder mit Alkohol und dampfte diesen nach

vollständiger Extraktion nochmals ein. Dieses Ausziehen mit Alkohol, Eindampfen der alkoholischen Lösung und wieder Extrahieren des zurückgebliebenen Restes wiederholte ich noch dreimal. Zum Schluss zog ich die leichte pulverige Substanz mit Alkohol absol. aus, dampfte bis auf 3—4 ccm ein und liess erkalten. Ich erhielt dabei etwa 0.06 g eines fast weissen leichten baryumfreien Pulvers, welches unter dem Mikroskop ganz kleine gleichmässige Schuppen zeigte die bei 243°—248° unter Zersetzung schmolzen.

0.0495 g Substanz brauchten bei der Bestimmung nach *Kjeldahl* zur Bindung des Ammoniaks 4.2 ccm $^1/_{10}$ norm. H_2SO_4 entsprechend 11.47 % N.

b) Aus der braunen vom Baryumniederschlag abfiltrierten alkoholischen Flüssigkeit, wurde der Zucker wie früher mit p. Bromphenylhydrazin als Osazon abgeschieden.

Spaltung des bei der Dialyse aus dem Aussenwasser gewonnenen Invertins

45 g Invertin aus dem Aussenwasser, entsprechend ca. 30 g aschenfreie Substanz wurden mit 500 ccm 2.5 % Schwefelsäure gekocht und dann, wie schon früher angegeben, mit Phosphorwolframsäure behandelt.

1. Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag wurde wie früher behandelt und lieferte dabei aus der ammoniakalischen Lösung mit Silber 0.2133 g eines braunen Niederschlages.

0.1034 g trockener Substanz gaben 0.0185 g H_2O, 0.0532 g CO_2 und hinterliessen 0.0729 g Ag, entsprechend 14,06 % C, 2.00 % H und 70.5 % Ag.

0.1099 g Substanz gaben bei + 11° und 728 mm Bar. 9.5 ccm Stickstoff = 9.89 % N.

Aus diesen Zahlen stellt sich folgende Formel zusammen, vorausgesetzt dass der Körper rein wäre: $Ag_3C_5H_9N_3O$ = Mol. Gew. 451. Das aus dem gefundenen Silber berechnete Mol. Gew. wäre 459.

Aus dem ammoniakalischen silberhaltigen Filtrat wurde nach Zusatz von Salpetersäure im Überschuss sehr wenig eines stickstoffhaltigen Körpers ausgeschieden, der wegen Mangel an Substanz nicht untersucht werden konnte.

2. Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Dieses Filtrat wurde wie die zwei ersten gleichfalls mit Baryumhydroxyd im Überschuss versetzt, dann mit Schwefelsäure noch 5 Stunden gekocht, nach dem Neutralisieren mit Baryumcarbonat bis auf 100 ccm eingedampft und mit der 8 bis 10 fachen Menge Alkohol übergossen. Dabei entstand wieder ein baryumhaltiger Niederschlag (a), während der Zucker in Alkohol gelöst blieb.

a) Der Niederschlag wurde mit warmen Alkohol von 95 % vollständig extrahiert, der nach dem Abdampfen des gelben Alkohols zurückgebliebene Rest aber wieder solange als sich noch etwas löste mit absolutem Alkohol ausgezogen und dann das Filtrat bis zur beginnenden Ausscheidung einer fester Substanz langsam eingedampft. Dann liess ich erkalten und filtrierte vom Niederschlag ab, den ich im Vakuum über Schwefelsäure trocknete.

Die Ausbeute an diesen Körper, der bei 245°—247° unter Zersetzung schmolz und jedenfalls mit dem vorher aus 30 g Invretin, das aus dem Innern des Dialysators gewonnen war, erhaltenen identisch ist, betrug 0.7618 g.

Unter dem Mikroskop betrachtet zeigt dieser Körper kleine gleichmässige Schuppen; er reduciert *Fehling*'sche Lösung nicht, ist leicht löslich in Wasser, wenig in Alkohol, unlöslich in Äther. Die wässerige Lösung reagiert neutral, gibt mit Silber eine Trübung die erst nach Zusatz von sehr viel Ammoniak wieder verschwindet und löst Kupferoxydhydrat mit blauer Farbe.

0.1213 g Substanz gaben 0.0982 g H_2O und 0.2158 g CO_2 = 48.52% C und 9.05% H

0.1352 g Substanz gaben 0.1096 g H_2O und 0.2425 g CO_2 = 48.92% C und 9.06% H

0.2082 g Substanz gaben bei + 14° und 729 mm Bar. 24.6 ccm N = 11.70% N.

Die bei den Analysen gefundenen Zahlen machen es wahrscheinlich, dass hier ein Gemenge zweier Amidosäuren vorliegt, deren eine vielleicht $C_4H_9NO_2$, die andere $C_5H_{11}NO_2$ ist.

Berechnet für:

$C_4H_9NO_2$	$C_5H_{11}NO_2$	gefunden:
C = 46.6%	C = 51.3%	C = 48.72%
H = 8.7%	H = 9.3%	H = 9.05%
N = 13.6%	N = 12.0%	N = 11.70%

b) Die alkoholische vom Baryumsalz abfiltrierte Flüssigkeit, dampfte ich bis auf 100 ccm im Vakuum ein und versetzte sie mit einer Lösung von 10 g Bromphenylhydrazin und etwas Natriumacetat in 150 ccm Wasser welches mit Essigsäure angesäuert war. Nach einigem Stehen in der Kälte schied sich eine rötlich-weisse Verbindung aus, die abgesaugt, mit warmen Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und zuletzt aus viel siedendem 60%igen Alkohol umkrystallisiert wurde. Die Krystallmasse schmolz unter Zersetzung bei 209°.

0.4256 g Substanz gaben nach *Kjeldahl* 0.0336 g N = 7.98 %. Schmelzpunkt, Stickstoffgehalt und Löslichkeitsverhältnisse sprechen dafür, dass wir hier das Bromphenylhydrazon der Mannose haben. Man sieht hier wieder, dass auch das aus dem Aussenwasser des Dialysators gewonnene Invertinpräparat bei der Spaltung mit Sauren Mannose liefert.

Beobachtungen über einige Bedingungen, welche die Wirksamkeit des Invertins beeinflussen.

a) Einwirkung von Alkohol.

Wie schon erwähnt, wurde die Wirksamkeit des aus Presshefe extrahierten Invertins schon bei gewöhnlicher Temperatur von Alkohol gehemmt, ja ging unter seinem Einfluss manchmal sogar ganz verloren.

Bei der Darstellung des Invertins aus Bierhefe dagegen, konnte ich selbst in Fällen wo die Präparate 30 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit Alkohol in Berührung gestanden hatten, wenigstens qualitativ keine Schwächung des Enzyms beobachten. Um genaueren Aufschluss darüber zu erlangen, ob meine aus Bierhefe hergestellten Präparate gegen Alkohol wirklich unempfindlich seien, stellte ich quantitative Versuche an.

Ich übergoss zuerst vier Portionen von ein und demselben Präparat, jedesmal 0.5 g in einem Reagensglase mit 25 ccm absoluten Alkohols, liess sie dann unter öfterem Umschütteln bei 17°—18° verschiedene Zeit lang stehen und filtrierte den Alkohol von der ersten Portion am 2. Tage, von der zweiten am 5. Tage, von der driten am 7. Tage ab und von der vierten nach 25 Tagen. Alle diese Präparate wurden über Schwefelsäure getrocknet und erwiesen sich am Ende noch als wirksam.

Um die enzymatische Kraft dieser Präparate unter einander zu vergleichen, musste ich zuerst den Rohrzuckergehalt der zu invertierenden Rohrzuckerlösung genau kennen.

Zuerst stellte ich mir eine grössere Menge einer ca. 10% igen Rohrzuckerlösung dar, in der ich den Zuckergehalt polarimetrisch im 2 dm. Rohr des *Landolt*'schen Apparates von *Schmidt* und *Hänsch* bestimmte.

Zu diesem Zweck wurden 45 ccm der Rohrzuckerlösung mit 5 ccm Wasser verdünnt und dann polarimetrisch untersucht. Anderseits wurden 45 ccm der ursprünglichen Rohrzuckerlösung mit 5 ccm Salzsäure von Sp. Gew. 1.125, bei 67°—70° C vollständig invertiert und nach dem Abkühlen wiederum mit dem Polarimeter geprüft. Aus der Summe der Drehungswinkel vor und nach der vollständigen Inversion lässt sich der Gehalt an Rohrzucker nach der Formel

$$p = \frac{\alpha + \alpha'}{l\,[0.898 - 0.00304\,(t' - 20)]}$$ berechnen.

p gibt an die Gramme Rohrzucker in 100 ccm der verdünnten Lösung.

α ist der Drehungswinkel der Lösung von der Inversion.

α' ist der Drehungswinkel nach vollständiger Inversion mit Säure.

l ist die Länge des Polarisationsrohres in dm.

t' ist die während der Polarisation herrschende Temperatur.

Die verwendete Zuckerlösung drehte bei 20° die Ebene des polarisierten Lichtes vor der Inversion um 12.72° nach rechts, nach der Inversion 3.95° nach links.

$$p = \frac{12.72 + 3.95}{2\,[0.898 - 0.00304\,(20-20)]} = \frac{16.67}{1.7899} = 9.31 \text{ g}$$

Rohrzucker in 100 ccm Lösung.

Zur Bestimmung der enzymatischen Kraft eines Invertinpräparates wurden 45 ccm der ursprünglichen Zuckerlösung in einem dünnwandigen Kolben zuerst im constanten Wasserbade auf die gewünschte Temperatur gebracht, dann mit 5 ccm einer Invertinlösung, die 0.01 g Invertin enthielt, versetzt und nachdem das Invertin bei constanter Temperatur eine bestimmte Zeit eingewirkt, das Ganze in siedendes Wasser getaucht und darin einige Minuten erhalten, um durch Zerstörung des Invertins jede weitere Inversion des Rohrzuckers zu verhindern. Nach dem Abkühlen wurde wieder polarisiert und nach der angegebenen Formel der noch nicht zerlegte Rohrzucker bestimmt. In diesem Falle ist α der jetzt abgelesene Drehungswinkel, während α' derselbe wie oben abgelesene Drehungswinkel der vollständig invertierten Zuckerlösung ist; wenn α linksdrehend ist, so ist in die Formel $\alpha' - \alpha$ und nicht $\alpha + \alpha'$ zu setzen. Zieht man den jetzt gefundenen Rohrzucker von der früher bestimmten Menge ab, so erfährt man die von Invertin zerlegte Menge Rohrzucker. Da die 45 ccm Rohrzuckerlösung jedesmal mit 5 ccm verdünnt wurden, so kann diese Verdünnung unberücksichtigt bleiben z. B.

Die Zuckerlösung, die eine Stunde lang bei 35^0 der Wirkung von 0.01 g Invertin ausgesetzt gewesen, drehte bei 20^0 die Ebene des polarisierten Lichtes um $+ 6.32^0$. Der Gehalt des noch nicht invertierten Rohrzuckers ist somit:

$$p = \frac{6.32 + 3.95}{2\,[0.898 - 0.00304\,(20-20)]} = \frac{10.27}{1.7899} = 5.73 \text{ g}$$

Rohrzucker in 100 ccm Lösung.

Die nicht invertierte Rohrzuckerlösung enthält 9.31 g Rohrzucker in 100 ccm, die vom Invertin nur teilweise invertrierte Lösung nur 5.73 g in 100 ccm also um 3.58 g weniger. Die Menge des invertierten Rohrzuckers beträgt somit 3.58 g in 100 ccm oder 38.45 % von der angewandten Zuckermenge.

Auf diese Weise konnte ich jedesmal die von 0.01 g Invertin bei 35° nach ein und nach zwei Stunden zerlegte Menge Rohrzucker erfahren.

Präparat:	0.01 g invertierten in 50 cc einer 9.31 % Rohrzuckerlösung bei 35°			
	nach einer Stunde,		nach zwei Stunden,	
	% Rohrzucker	% des angewandten Zuck.	% Rohrzucker	% des angewandten Zuck.
I ohne Alkohol behandelt	3.58	38.45	6.15	66.06
II 2 Tage	3.34	35.87	5.76	61.87
III 5 Tage	3.21	34.48	5.73	61.54
IV 7 Tage	3.24	34.80	5.53	59.39
V 25 Tage	2.79	29.96	5.17	55.53
mit Alkohol behandelt				

Hieraus ist mit Deutlichkeit zu ersehen, dass auch mein aus Bierhefe dargestelltes Invertin bei Zimmertemperatur durch Alkohol geschwächt wird, wenn auch bei kurzer Einwirkungsdauer die schädliche Wirkung sehr minimal ist.

b) Wirksamkeit des Invertins bei 0°.

Als ich einmal eine bis auf 0° abgekühlte Rohrzuckerlösung mit Invertin versetzte und dann einfrieren

liess, bemerkte ich am nächsten Tag beim Auftauen und nach dem Kochen mit *Fehling*'scher Lösung, dass trotz der niederen Temperatur ziemlich viel Rohrzucker invertiert worden war.

Die quantitative Bestimmung des invertierten Rohrzuckers führte ich in der angegebenen Weise aus. Ich versetzte die auf 0° abgekühlte Rohrzuckerlösung mit Invertin und liess dann die Mischung einfrieren, nach einer bestimmten Zeit wurden die Kolben, um weitere Inversion zu verhindern, auf einige Minuten in siedendes Wasser eingetaucht.*)

0.01 g Invertin No. 2 invertierten in 50 ccm einer 9.31 % igen Rohrzuckerlösung bei 0° nach:	% Rohrzucker	% v. d. angewandten Zuckermenge
3 Stunden	1.34	14.39
6 Stunden	2.07	22.23
22 Stunden	6.42	68.95
29 Stunden	7.41	78.59
8 Tagen	9.23	99.14

In der nachstehenden Tabelle habe ich neben zwei Präparaten aus Bierhefe, zum Vergleich auch noch ein aus Presshefe hergestelltes Präparat aufgenommen.

In diesen Zahlen haben wir ein Beispiel für die Anpassung der Enzyme. Man sieht, dass die untergärige Bierhefe die in der Praxis bei + 2° bis 8° arbeitet, ein Invertin ausscheidet, welches bei 0° noch ganz gut wirkt, während dasjenige der obergärigen Presshefe bei dieser niederen Temperatur fast unwirksam ist.

*) Bei Kolben aus gutem Glase darf man das dreist wagen, ohne ein Springen derselben befürchten zu müssen.

	0.01 g des Präparates invertierte in 50 cc einer 9.44 % igen Rohrzuckerlösung bei 0°					
	nach 3 Stunden		nach 6 Stunden		nach 22 Stunden	
	% Rohrzucker	% der angewandten Zuckermenge	% Rohrzucker	% der angewandten Zuckermenge	% Rohrzucker	% der angewandten Zuckermenge
Invertin No. 3	0.16	1.69	0.37	3.92	1.07	11.33
Invertin No. 5	1.39	14.72	2.57	27.22	6.43	68.11
Invertin aus Presshefe	0.03	0.31	0.04	0.42	0.13	1.37

Zusammenfassung der wichtigsten Resultate:

1. Was den Aschengehalt der Invertinpräparate betrifft, so kann man denselben, wie schon *Sullivan* und *Tompson, Osborne* und *Kölle* zeigten, ohne dass deshalb die Wirksamkeit der Präparate Schaden leidet, durch Dialyse sehr herabdrücken, wenn auch bisher nicht ganz beseitigen. Die Basen der Asche gehören höchst wahrscheinlich nicht zur Konstitution des wirksamen Enzymes. Da aber durch das Ausfällen der Phosphorsäure mit Magnesiasalz und durch nachfolgende Dialyse jedesmal Präparate gewonnen werden, die beim Veraschen mit $Ba(OH)_2$ wenig eigene Asche zurücklassen, der Phosphorsäuregehalt derselben aber bis über 80 % betragen kann, so liegt die Vermutung nahe, dass ein ziemlich grosser Teil des Phosphors in den Präparaten organisch gebunden ist, eine Vermutung die durch eine einfache Rechnung (siehe oben) in der Tat bestätigt wird.

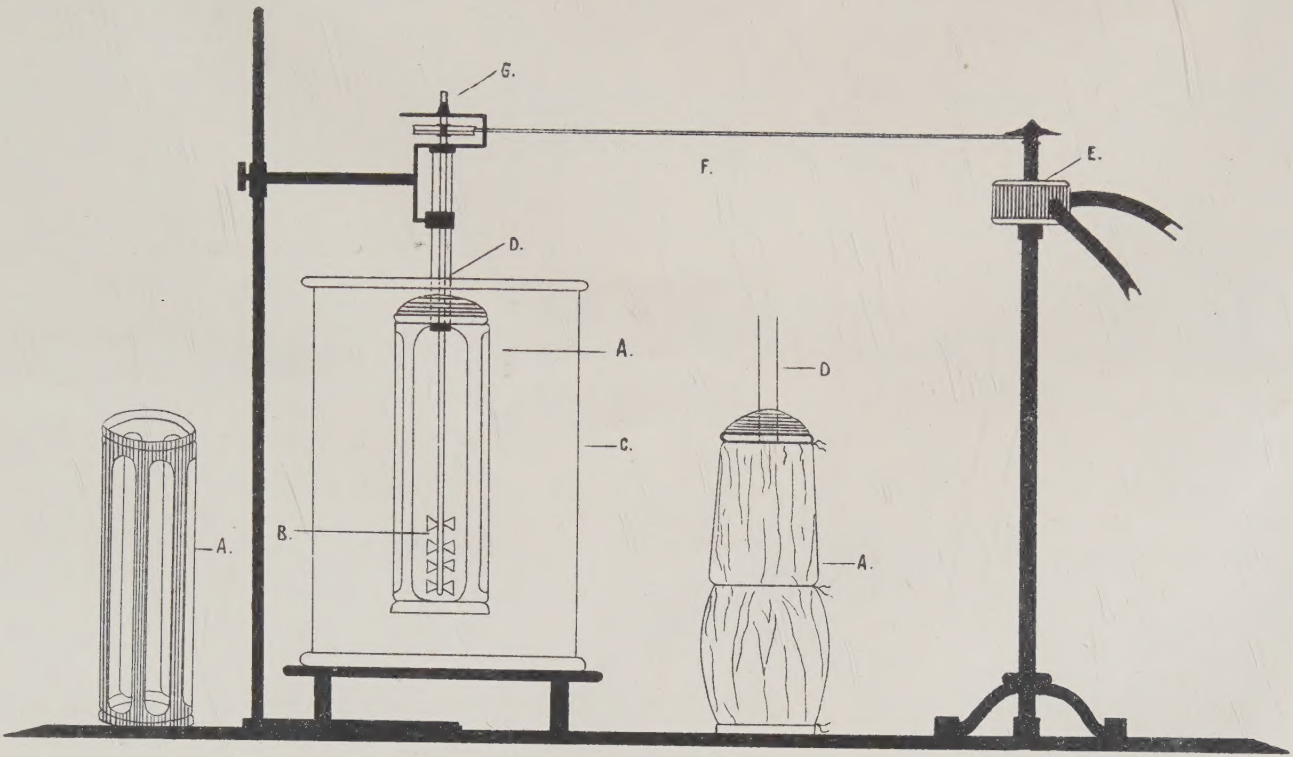
2. Der Umstand, dass das Invertin ziemlich reichlich durch dichtes Pergamentpapier zu diffundieren vermag,

ferner die Tatsache, dass auch durch eine längere Einwirkung von Pankreasferment seine Wirksamkeit in keiner Weise geschädigt wird, sprechen entschieden dagegen, dass wir in ihm eine Proteinsubstanz oder auch nur ein höheres Proteinderivat (Albumose, Pepton) vor uns haben.

3. Wie manigfache Versuche zeigten, ist es unmöglich nach den bisher vorgeschlagenen Verfahren, das Kohlenhydrat aus den Invertinpräparaten zu entfernen, ohne die Wirksamkeit des Enzyms selbst herabsetzen oder ganz zu zerstören. Da sich ferner das „Gummi" auch durch Dialyse nicht beseitigen lässt, sondern da es im Gegenteil zugleich mit der wirksamen Substanz durch die Pergamentmembran hindurch diffundiert so ist es, solange nicht das Gegenteil direkt bewiesen ist, umgereimt anzunehmen, dass das „Hefegummi", oder ein Teil desselben einen intergrierenden Bestandteil des wirksamen Enzymes bildet.

4. Wie schon die wenigen Versuche über die Spaltung meiner Invertinpräparate wahrscheinlich machen, haben wir im Invertin trotz des ziemlich grossen Gehaltes am organischem Phosphor, wegen der Abwesenheit von Purinbasen, auch keinen Nukleinsäure-artigen, sondern vielmehr einen Körper eigenartiger Natur vor uns.

Es ist nicht unmöglich, dass die wirksame Substanz eine komplicierte Phosphorsäure ist, deren verschiedene Hydroxylgruppen zur Bindung teils von stickstoffhaltigen Gruppen, teils von Kohlenhydraten, dienen.


G.
F.
E.
D.
A.
C.
B.
A.
D
A.